

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA (DPTO. CIRUGIA II)
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OFTALMOLÓGICAS
"RAMON CASTROVIEJO"**

***"ESTUDIO DE LA INERVACIÓN COROIDEA
MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE ANTICUERPOS
FRENTE A LA PROTEÍNA GFA Y
NEUROFILAMENTOS"***

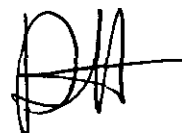
TESIS DOCTORAL

ROSA DE HOZ MONTAÑANA

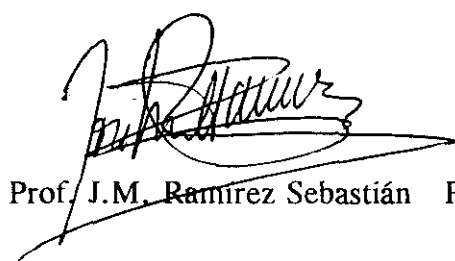
Dirigida por: **PROF. D. JOSE MANUEL RAMÍREZ SEBASTIÁN**
Profesor Titular de Oftalmología
Facultad de Medicina de la U.C.M.

PROF. D. ALBERTO TRIVIÑO CASADO
Profesor Titular de Oftalmología
Facultad de Medicina de la U.C.M.

Vº Bº



Rosa De Hoz Montañana



Prof. J.M. Ramirez Sebastián



Prof. Alberto Triviño Casado



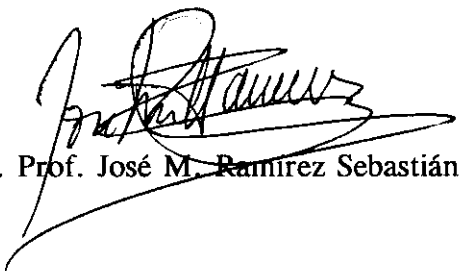
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
OFTALMOLOGICAS
«RAMON CASTROVIEJO»

JOSÉ MANUEL RAMÍREZ SEBASTIÁN, Profesor Titular de Oftalmología de la
Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y
ALBERTO TRIVIÑO CASADO, Profesor Titular de Oftalmología de la
Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

C E R T I F I C A N : Que *Dña. Rosa de Hoz Montañana*, ha realizado
bajo su dirección los trabajos de investigación
correspondientes a su Tesis Doctoral titulada:
"ESTUDIO DE LA INERVACIÓN COROIDEA
MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE
ANTICUERPOS FRENTE A LA PROTEÍNA GFA
Y NEUROFILAMENTOS", que ha terminado con
el mayor aprovechamiento.

Revisado el trabajo, quedan conformes con su presentación para ser juzgado.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firman el presente
certificado en Madrid a veintidos de mayo de mil novecientos noventa y cinco.



Fdo. Prof. José M. Ramírez Sebastián



Fdo. Prof. Alberto Triviño Casado



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID

HOSPITAL CLINICO DE SAN CARLOS
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA II
(ESPECIALIDADES QUIRURGICAS)

FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID

MARIA ROSA VILAS DIAZ, Profesora Titular de Otorrinolaringología y Directora del Departamento de Cirugía II (Especialidades Quirúrgicas) de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

C E R T I F I C A : Que la Tesis Doctoral presentada por *Dña. Rosa de Hoz Montañana*, titulada: "ESTUDIO DE LA INERVACIÓN COROIDEA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A LA PROTEÍNA GFA Y NEUROFILAMENTOS", ha sido realizada bajo la dirección de los Profesores D. José M. Ramírez Sebastián y D. Alberto Triviño Casado, y revisado su contenido, quedo conforme con su presentación para ser juzgada.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Madrid a veintidos de mayo de mil novecientos noventa y cinco.

Vilas



*"Pero en tan difíciles dominios la verdad
completa rara vez surge de golpe. Se forja poco a
poco, tras muchos tanteos y rectificaciones"*

(Santiago Ramón y Cajal)

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS.

Aunque pueden ser muchas las personas que me han brindado su ayuda desinteresada estos últimos años, y aun a riesgo de caer en el error de no citar alguna de ellas, deseo expresar mi más profundo agradecimiento:

En primer lugar al **Prof. Julián García Sánchez**, por la oportunidad que me brindó de poder incorporarme a su grupo de investigación en el Instituto Ramón Castroviejo; así como por su constante estímulo y apoyo para la realización de esta tesis.

En segundo lugar, mi más sincero agradecimiento a los **Profesores D. Jose Manuel Ramírez Sebastián y D. Alberto Triviño Casado**, quienes además de introducirme e iniciarme en el mundo de la investigación, ha hecho posible que nazca en mi la pasión por la histología ocular, siendo el ejemplo a seguir en el trabajo que conlleva una investigación y sobre todo guiando mis pasos. Sin su ayuda constante y sus consejos no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Para la **Dra. Ana Isabel Ramírez Sebastián** y el **Dr. Juan José Salazar Corral**, no puedo encontrar palabras de agradecimiento ya que con su constante ayuda, colaboración, consejos y apoyo, he podido llevar este trabajo a buen término.

A todos mis compañeros del Instituto Ramón Castroviejo, y en especial a **Viñas, Carmen y Elvira**, quienes en todo momento me brindaron su ayuda y apoyo.

Finalmente tengo que reconocer la deuda ilimitada que tengo con mis padres y toda mi familia por todo lo que han hecho por mí.

ÍNDICE.

| | |
|---|--------|
| 1.- INTRODUCCIÓN | - 1 - |
| 1.1.- INERVACIÓN GENERAL DEL GLOBO OCULAR. | - 2 - |
| 1.1.1.- <i>VÍA SIMPÁTICA</i> | - 2 - |
| 1.1.2.- <i>VÍA PARASIMPÁTICA.</i> | - 4 - |
| 1.1.3.- <i>VÍA SENSITIVA.</i> | - 5 - |
| 1.2.- ESTUDIOS SOBRE LA INERVACIÓN COROIDEA A LO LARGO DE LA HISTORIA. | - 7 - |
| 1.2.1.- <i>ESTUDIOS MEDIANTE IMPREGNACIONES ARGÉNTICAS.</i> | - 8 - |
| 1.2.2.- <i>ESTUDIOS MEDIANTE TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS</i> | - 22 - |
| 1.2.3.- <i>ESTUDIOS DE LA INERVACIÓN COROIDEA MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS</i> | - 39 - |
| 1.2.3.1.- Conceptos generales sobre las técnicas inmunohistoquímicas. | - 39 - |
| 1.2.3.2.- Estudios inmunohistoquímicos de la inervación coroidea mediante el empleo de difentes marcadores. | - 41 - |
| A.- <i>Estudios con anticuerpos frente a neuropéptidos</i> | - 41 - |
| * El péptido vasoactivo intestinal (VIP) como marcador de las fibras nerviosas coroideas | - 42 - |
| * El Neuropéptido-Y (NP-Y) como marcador de las fibras nerviosas coroideas | - 53 - |
| * La sustancia P (SP) como marcador de las fibras nerviosas coroideas | - 57 - |
| * Otros péptidos marcadores de las fibras nerviosas coroideas | - 59 - |
| B.- <i>Estudios mediante técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos frente a filamentos intermedios</i> | - 65 - |
| * Estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos frente a la PGFA | - 66 - |
| # Características generales de la PGFA | - 66 - |
| # Estudios mediante anticuerpos marcadores de la PGFA | - 67 - |

| | |
|---|------------|
| * Estudios mediante técnicas inmunohistoquímicas con Ac. frente a neurofilamentos | - 68 - |
| # Características generales de los NFs | - 68 - |
| # Características estructurales de los NF | - 70 - |
| # Fosforilación de los NF | - 71 - |
| # Estudios de la inervación coroidea mediante Ac. marcadores de los NF | - 72 - |
| 2.- JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS | - 76 - |
| 3.- MATERIAL Y MÉTODOS | - 79 - |
| 3.1.- CASUÍSTICA | - 79 - |
| 3.2.- DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS | - 80 - |
| 3.2.1.- <i>IMPREGNACIONES ARGÉNTICAS</i> | - 80 - |
| 3.2.1.1.- Obtención del tejido. Montajes planos de coroides . . . | - 80 - |
| 3.2.1.2.- Realización de las tinciones | - 81 - |
| A.- <i>Método de Cajal para la tinción de las neurofibrillas.</i> . . | - 81 - |
| B.- <i>Modificación de Liss a la triple impregnación argéntica de Del</i> <i>Río Hortega</i> | - 83 - |
| 3.2.2.- <i>TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS</i> | - 85 - |
| 3.2.2.1.- Obtención del tejido | - 85 - |
| 3.2.2.2.- Anticuerpos utilizados | - 86 - |
| 3.2.2.3.- Realización de las inmunotinciones | - 87 - |
| A.- <i>Técnica de la PAP en montajes planos con anti-PGFA</i> . . | - 88 - |
| B.- <i>Técnica de la PAP en montajes planos con anti-NF</i> | - 89 - |
| 4.- RESULTADOS | - 92 - |
| 4.1.- ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LA INERVACIÓN COROIDEA CON TÉCNICAS DE PLATA | - 93 - |

| | |
|---|---------|
| 4.1.1.- <i>MORFOLOGÍA DE LAS FIBRAS NERVIOSAS</i> | - 93 - |
| 4.1.1.1.- Fibras perivasculares | - 94 - |
| 4.1.1.2.- Fibras intervasculares | - 96 - |
| A.- <i>Plexos nerviosos coroideos</i> | - 97 - |
| B.- <i>Fibras nerviosas intervasculares independientes</i> | - 98 - |
| 4.1.2.- <i>MORFOLOGÍA DE LOS TIPOS CELULARES ASOCIADOS A LAS FIBRAS NERVIOSAS</i> | - 99 - |
| 4.1.2.1.- Células ganglionares coroideas | - 99 - |
| 4.1.2.2.- Melanocitos coroideos | - 100 - |

4.2.-. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LA INERVACIÓN COROIDEA CON TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS - 101 -

| | |
|--|---------|
| 4.2.1.- <i>ESTUDIO CON ANTI-PGFA</i> | - 101 - |
| 4.2.1.1.- Localización de las fibras nerviosas | - 101 - |
| 4.2.1.2.- Morfología y distribución de las fibras nerviosas | - 103 - |
| A.- <i>Fibras perivasculares</i> | - 103 - |
| B.- <i>Fibras intervasculares</i> | - 104 - |
| 4.2.1.3.- Marcaje de otros elementos coroideos | - 105 - |
| 4.2.2.- <i>ESTUDIOS EMPLEANDO ANTICUERPOS CONTRA NEUROFILAMENTOS</i> | - 106 - |
| 4.2.2.1.- ESTUDIO CON ANTI NF-68 | - 106 - |
| A.- <i>Localización de las fibras nerviosas</i> | - 106 - |
| B.- <i>Morfología y distribución de las fibras nerviosas</i> | - 108 - |
| * Fibras perivasculares | - 108 - |
| * Fibras intervasculares | - 109 - |
| C.- <i>Marcaje de otros elementos coroideos</i> | - 111 - |
| 4.2.2.2.- ESTUDIO CON ANTI NF-160 | - 111 - |
| A.- <i>Localización de las fibras nerviosas</i> | - 111 - |
| B.- <i>Morfología y distribución de las fibras nerviosas</i> | - 113 - |
| * Fibras perivasculares. | - 113 - |
| * Fibras intervasculares | - 115 - |
| C.- <i>Marcaje de otros elementos coroideos</i> | - 119 - |
| 4.2.2.3.- ESTUDIO CON ANTI NF-200 | - 120 - |
| A.- <i>Localización de las fibras nerviosas</i> | - 120 - |

| | |
|---|---------|
| B.- <i>Morfología y distribución de las fibras nerviosas</i> | - 122 - |
| * Fibras perivasculares | - 122 - |
| * Fibras intervasculares | - 124 - |
| C.- <i>Marcaje de otros elementos coroideos</i> | - 127 - |
| * Células ganglionares coroideas | - 127 - |
| * Melanocitos coroideos | - 128 - |
| 5.- DISCUSIÓN | - 166 - |
| 5.1.- LOCALIZACIÓN DE LAS FIBRAS NERVIOSAS COROIDEAS | - 166 - |
| 5.2.- MORFOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN DE LAS FIBRAS NERVIOSAS | - 180 - |
| 5.3.- MORFOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS RELACIONADAS CON LAS FIBRAS NERVIOSAS COROIDEAS | - 202 - |
| 5.3.1.- <i>CÉLULAS GANGLIONARES</i> | - 202 - |
| 5.3.2.- <i>MELANOCITOS</i> | - 208 - |
| 6.- CONCLUSIONES | - 214 - |
| 7.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | - 218 - |

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

Para poder iniciar el estudio de la inervación coroidea es necesario, por un lado, un conocimiento previo de la inervación general del globo ocular; y por otro, el conocimiento de los distintos trabajos que se han realizado a lo largo de la historia sobre la inervación de esta capa.

Razón por la cual hemos dividido la Introducción en los siguientes apartados:

- 1.- Inervación general del globo ocular.
- 2.- Inervación coroidea: revisión histórica.
 - 2.1.- Estudios mediante impregnaciones argénticas.
 - 2.2.- Estudios mediante técnicas histoquímicas.
 - 2.3.- Estudios mediante técnicas inmunohistoquímicas.

1.1.- INERVACIÓN GENERAL DEL GLOBO OCULAR.

A excepción de las fibras del nervio óptico, el resto de la inervación ocular se lleva a cabo por fibras simpáticas y parasimpáticas del sistema nervioso autónomo; y por fibras sensitivas somáticas del sistema nervioso central (S.N.C.). (GRIMES, 1960⁵⁰; BEATIE, 1961³; DUKE-ELDER, 1961²⁵; CASTRO-CORREIA, 1961¹⁸).

1.1.1.- VÍA SIMPÁTICA.

La vía simpática comienza en la región hipotalámica en el centro de Karpus-Kreidl, este centro se relaciona por un lado con el núcleo del III par, y por otro con el núcleo protuberancial de Babinsky; también y posteriormente con el centro bulbar de Budge, desde donde las fibras simpáticas descendentes se dirigen hacia los segmentos octavo cervical, y primero/segundo torácicos, donde se encuentra el centro cilio-espal de Budge-Waller de la médula espinal (DUKE-ELDER, 1961²⁵; REEH, 1981¹⁰⁰).

Las fibras abandonan la médula y siguen sin interrupción por medio de los ramos comunicantes blancos hacia los ganglios torácicos superiores, de aquí pasan al ganglio cervical inferior, y desde éste atravesando el asa subclavia o de Viussens, llegan al ganglio cervical medio, alcanzando posteriormente al ganglio cervical superior donde se produce la primera sinapsis.

A partir de ahí, las fibras postsinápticas abandonan el ganglio distribuyéndose por el plexo de la carótida interna. Desde este plexo las fibras postsinápticas van a poder seguir varias rutas o caminos (REEH, 1981¹⁰⁰):

- a): Parte de las fibras se dirigen desde el plexo hacia el ganglio de Gasser uniéndose posteriormente a la rama nasal de la división oftálmica del trigémino (Va), corren a lo largo de esta rama y de su subrama nasociliar hasta formar parte de los nervios ciliares largos que penetran en la esclerótica en la vecindad del nervio óptico. (BEATIE, 1961³; CASTRO-CORREIA, 1961¹⁸; HOGAN, 1971⁵⁴).

- b): Otras fibras de este plexo carotídeo simpático van a formar parte del plexo retroorbitario autónomo, del que también forman parte las fibras parasimpáticas y simpáticas procedentes del ganglio esfenopalatino. Las fibras eferentes, tanto simpáticas como parasimpáticas, de este entran en la órbita a través de la hendidura orbitaria superior, situándose próximas a la arteria oftálmica y a sus ramas; una parte de estas fibras se disponen en la adventicia de las arterias ciliares, algunas se unen a los nervios ciliares cortos y largos pasando a formar parte de ellos, y por último el resto penetran independientemente en la esclera próximas al nervio óptico (KUWAYAMA, 1987⁶²).

- c): Por otro lado, algunas de las fibras simpáticas del plexo carotideo penetran en la órbita, y se dirigen hacia el ganglio ciliar atravesándolo sin hacer sinapsis, para formar junto con las fibras parasimpáticas postganglionares y las fibras sensitivas de origen trigeminal los nervios ciliares cortos que, posteriormente penetrarán en el globo ocular en la vecindad del nervio óptico (BEATIE, 1961³; CASTRO-CORREIA, 1961¹⁸; HOGAN, 1971⁵⁴).

- d): Por último, el plexo de la carótida interna forma una rama, llamada nervio petroso profundo, que se une a la rama del nervio facial petroso superficial mayor para constituir el nervio vidiano. Este nervio lleva fibras simpáticas al ganglio esfenopalatino, que posteriormente abandonan el ganglio con el resto de fibras postganglionares para, también alcanzar, el plexo retroorbitario ya descrito (RUSKELL, 1970a,b;1971^{103,104,105}).

La mayoría de las fibras simpáticas vehiculadas por los nervios procedentes del plexo retroorbitario, los nervios ciliares largos y los nervios ciliares cortos, constituyen un segundo plexo en la vaina superior del nervio óptico, antes de penetrar en la esclera (KUWAYAMA, 1987⁶²).

1.1.2.- VÍA PARASIMPÁTICA.

La vía parasimpática tiene un doble origen:

- a): En el tronco cerebral a nivel del núcleo de Eddinger-Westphal, cercano a los núcleos del III y VII pares craneales, se originan las fibras parasimpáticas que se unen a las del III par y las acompañan en su recorrido atravesando el tendón de Zinn. El motor ocular común, o III par, a su vez, se divide en dos ramas (superior e inferior). De la rama inferior sale una pequeña ramificación llamada raíz corta o motora del ganglio que se dirige al ganglio ciliar. En él, las fibras parasimpáticas hacen sinapsis, y como fibras postganglionares, junto con las fibras simpáticas y sensitivas que atraviesan el ganglio sin sinaptar, forman los nervios ciliares cortos, penetrando en el globo ocular en la vecindad del nervio óptico (DUKE-ELDER, 1961²⁵; REEH, 1981¹⁰⁰).

b): En un centro próximo al VII par, llamado núcleo lagrimo-muco-nasal, se originan el resto de las fibras parasimpáticas que se dirigen hacia la raíz sensorial del nervio facial, o VII par, para alcanzar al ganglio geniculado. Desde este ganglio y a través del nervio petroso superficial mayor llegan a formar parte del nervio vidiano hasta que alcanzan el ganglio esfenopalatino, donde hacen sinapsis junto con las fibras simpáticas que forman también parte de este nervio (RUSKELL, 1970a,b;1971^{103,104,105}). Todas las fibras postganglionares, tanto simpáticas como parasimpáticas, llegan a formar parte del plexo retroorbitario autónomo ya descrito, penetran en la órbita hasta situarse próximas a las arterias ciliares, alguna de las fibras se unen a los nervios ciliares largos y cortos, otras se situan en la adventicia de las arterias ciliares y, por último, otras penetran independientemente en la esclera (KUWAYAMA, 1987⁶²).

Antes de penetrar en el globo ocular, la mayoría de las fibras parasimpáticas vehiculadas por los nervios ciliares cortos y las procedentes del plexo retroorbitario, forman un plexo en la vaina superior del nervio óptico de la misma forma que lo hacían las fibras simpáticas (KUWAYAMA, 1987⁶²)

1.1.3.- VÍA SENSITIVA.

Las fibras sensitivas abandonan el ojo a través de los nervios ciliares largos y cortos (BEATIE, 1961³; CASTRO-CORREIA, 196¹¹⁸).

Las fibras sensitivas de los nervios ciliares largos, siguen un recorrido retrógrado por el nervio naso-ciliar y el nervio nasal (rama de la división oftálmica

del trigémino) hasta llegar al ganglio de Gasser, donde realizarán la primera sinapsis en sus neuronas sensitivas unipolares (BEATIE, 1961³; REEH, 1981¹⁰⁰).

Las fibras sensitivas de los nervios ciliares cortos atraviesan el ganglio ciliar sin hacer sinapsis, y desde aquí, siguen su recorrido retrógrado por la raíz larga del ganglio ciliar (rama del nervio nasal) hasta llegar al ganglio de Gasser, donde también hacen sinapsis (BEATIE, 1961³; REEH, 1981¹⁰⁰).

Las fibras postsinápticas del ganglio de Gasser continúan formando parte del nervio trigémino, o V par, hasta su salida en la protuberancia. En ella, contactan con los tres núcleos sensitivos del trigémino. Desde aquí las fibras descienden hasta el núcleo principal del trigémino, llegando por la médula espinal, hasta el nivel de la segunda o tercera cervical en un tracto polisináptico. Tras hacer sinapsis en el núcleo espinal las fibras se decusan y ascienden hasta alcanzar el núcleo ventro-postero-medial del tálamo donde finaliza la vía sensitiva (REEH, 1981¹⁰⁰).

1.2.- ESTUDIOS SOBRE LA INERVACIÓN COROIDEA A LO LARGO DE LA HISTORIA.

Estudiando los diferentes trabajos realizados a lo largo de la historia sobre la inervación coroidea, vemos que existen varias técnicas que se han ido sustituyendo unas por otras con el paso de los años.

Así podemos distinguir tres etapas dentro del estudio de la inervación coroidea según la técnica empleada: una primera etapa en la que los autores emplearon las técnicas de impregnaciones metálicas; una segunda etapa en la que los autores emplean técnicas histoquímicas de fluorescencia; y por último, una tercera etapa en la que utilizan las técnicas inmunohistoquímicas.

Aunque las tres etapas se solapan en el tiempo y, hay en la actualidad trabajos esporádicos con cualquiera de ellas, estas tres etapas son claramente diferenciables y representan distintos pasos en el avance de las investigaciones para esclarecer la inervación coroidea.

Los trabajos realizados en la primera etapa, como la mayoría de los realizados por los investigadores clásicos del Sistema Nervioso, fueron trabajos puramente morfológicos que sólo permitieron el estudio de los nervios ciliares y su distribución anatómica dentro de la coroides.

En la segunda etapa, al introducirse las técnicas histoquímicas que permiten diferenciar si las fibras nerviosas estudiadas son simpáticas o parasimpáticas, aparece un concepto funcional en la investigación que completa el trabajo morfológico. De esta forma no solamente se estudia la distribución de las fibras sino también su

posible origen dentro del Sistema Nervioso Autónomo y su función.

Con el desarrollo de las técnicas inmunohistoquímicas y su aplicación para el estudio de la innervación coroidea se introduce el concepto de especificidad. En esta última etapa los trabajos están fundamentalmente dirigidos al estudio de la función de las fibras nerviosas mas que a su distribución morfológica.

Por último, y para completar todos estos trabajos diversos autores han utilizado las técnicas de microscopía electrónica desde el final de la primera etapa hasta la actualidad, lo que ha permitido el conocimiento ultraestructural de la innervación coroidea.

1.2.1.- ESTUDIOS MEDIANTE IMPREGNACIONES ARGÉNTICAS.

La mayoría de los autores que se han dedicado al estudio de la innervación coroidea pertenecen a este siglo; aunque ya en el siglo pasado, algunos autores empezaron este estudio utilizando en sus inicios las clásicas técnicas de impregnaciones argénticas.

MÜLLER en 1857⁸⁷ describe la presencia de unas fibras musculares lisas en el estroma corioideo fuera de la pared de los vasos, junto con plexos de pequeños haces de fibras nerviosas a los lados de las arterias.

SCHWEIGGER (1860)¹⁰⁸ coincide con MÜLLER (187)⁽⁸⁷⁾ en sus observaciones, considerando la presencia de fibras musculares lisas asociadas a las arterias que son innervadas por plexos nerviosos ganglionares.

BIETTI (1895a,b)^{5,6}, utilizando técnicas de plata, observa que la coroides está ricamente inervada por ramas de los nervios ciliares, que atraviesan el espacio pericoroideo y forman plexos, cada vez más finos, en la capa más interna de la epicoroides y en las capas vasculares coroides, donde encuentra ramas muy finas con ensanchamientos pequeños y esféricos, en la muscular de los vasos.

SALZMANN (1912)¹⁰⁶, ya en este siglo, también realiza impregnaciones argénticas para estudiar los nervios ciliares, observando que estos nervios son casi todos mielinizados, su neurolema es extremadamente delgado y sus fibras tienen vaina de Schwann. Para este autor, coincidiendo con los anteriores, estos nervios se ramifican formando plexos en las capas internas de la supracoroides y en el estroma coroides, sobre todo en relación con los vasos. Muchas de estas ramas están formadas por muy pocas fibras o sólo una fibra aislada no mielinizada.

En los puntos nodales de los plexos y a lo largo de las ramificaciones describe grandes células ganglionares multipolares, las cuales están dispersas en los estratos vasculares más internos. Estas células son de origen probablemente simpático y tienen función vasomotora. Asimismo, y coincidiendo con BIETTI (1895)^{5,6} describe las terminaciones esféricas en forma de porra en relación con la muscular de los vasos.

ERNYER (1934)³⁴ estudia los tejidos oculares buscando específicamente las células ganglionares y sus relaciones con fibras mielinizadas y no mielinizadas. En contra de lo descrito por SALZMANN (1912)¹⁰⁶, afirma que no hay células ganglionares en ninguna zona de la coroides, solamente encuentra fibras pobremente mielinizadas que podrían ser interpretadas tanto como fibras sensoriales como fibras preganglionares autónomas.

ROSSI en 1936¹⁰¹, estudia minuciosamente la coroides del conejo albino y ratón utilizando las técnicas argénticas de *Golgi* y *Bielschowsky-Gross*, no encontrando tampoco células nerviosas en ninguna de las dos especies. Afirma que muchos elementos, descritos previamente como células nerviosas, serían melanóforos o células intersticiales del tejido conjuntivo coroideo. Asimismo, describe que la mayor parte de los troncos nerviosos coroides llegan a la coroides junto con los vasos ciliares cortos; por último, admite la influencia de una red nerviosa corioidea sobre el epitelio pigmentario observando fibras nerviosas intraepiteliales.

MATTEUCCI (1949)⁷⁹ estudia en profundidad el Sistema Nervioso Autónomo ocular describiendo la existencia de una inervación vasomotriz de la coroides que se origina en los nervios ciliares. Los fascículos nerviosos que acompañan a las arterias ciliares cortas posteriores, probablemente por su morfología, derivarían del plexo simpático pericarotideo. A pesar de la rica red de fibras nerviosas perivascular, no puede asegurar con sus trabajos una autonomía funcional uveal, ni la presencia de centros ganglionares vasomotores. Las células nerviosas que se pueden encontrar en la coroides serían una emigración esporádica de células desde el ganglio oftálmico, o desde el ganglio cervical superior, durante las primeras fases del desarrollo, careciendo de significado funcional; o simplemente, coincidiendo con ROSSI (1936)¹⁰¹ serían melanóforos o células intersticiales conectivas.

Por último, coincidiendo también con esta autor, observa nuevamente la existencia de un plexo nervioso que se extiende desde la capa profunda de la coroides al epitelio pigmentario sin interrupción, postulando la existencia de una posible inervación vegetativa entre la uvea y la retina.

MAWAS (1952)⁸⁴, en sus trabajos sobre inervación corioidea, con hematoxilina férrica, observa, coincidiendo con SALZMANN (1912)¹⁰⁶, células

nerviosas en la coroides, sobre todo a nivel de la supracoroides, entre la esclera y las capas vasculares coroides. También describe fibras nerviosas en la adventicia de los vasos de disposición espiroidea y, finalmente, de acuerdo con ROSSI (1936)¹⁰¹ y MATTEUCCI (1949)⁷⁹, admite la influencia de fibras nerviosas coroides sobre el epitelio pigmentario, describiendo fibras intraepiteliales.

KURUS (1955)⁶¹, realiza un estudio de las células ganglionares de la uvea con técnicas de plata, describiendo la presencia de células ganglionares en el segmento de coroides comprendido entre la ora serrata y el espolón escleral. Estas células están tan intensamente impregnadas por la plata que es difícil de distinguir elementos característicos de células nerviosas en ellas.

WOLTER, en ese mismo año (1955)¹⁴⁷, estudia los melanoblastos de la coroides humana con técnicas de plata, describiendo en su trabajo que existe una relación muy marcada entre los melanoblastos y los nervios coroides. En las capas más internas coroides el contacto entre el melanoblasto y la fibra nerviosa es muy íntimo, estando rodeadas las células ganglionares por melanocitos que forman satélites alrededor de ellas.

STOHR en 1957¹¹⁸, de acuerdo con ROSSI (1936)¹⁰¹ y MATTEUCCI (1949)⁷⁹, niega la presencia de células nerviosas en la coroides, postulando también su posible estirpe melánica o conjuntival.

Después de la controversia suscitada por la existencia o no de células nerviosas en la coroides a lo largo de todos estos trabajos realizados con impregnaciones metálicas, WOLTER en 1960¹⁴⁸, utiliza también estas técnicas para estudiar la coroides humana y, mediante la *tinción de plata de Del Río Hortega*

describe la presencia de dos tipos de fibras nerviosas:

- fibras procedentes de los nervios ciliares, que forman pequeños haces de fibras nerviosas, situándose en los espacios intervasculares de la coroides.
- fibras que se situan alrededor de los vasos, o fibras perivasculares.

Estos dos tipos de fibras nerviosas, perivasculares e intervasculares, representarían dos sistemas nerviosos coroides diferentes que se relacionan e interconectan fuertemente entre sí.

También describe fibras aisladas que son difíciles de reconocer, por la densa red de tejido conectivo, que también es argentófilo, próximo a ellas. Demuestra la presencia de una red terminal muy delicada que se sitúa en la coriocapilar y en la cara externa de la membrana de Bruch. Esta red de fibras no alcanza el epitelio pigmentario, en contra de lo descrito por ROSSI (1936)⁽¹⁰¹⁾ y MATTEUCCI (1949)⁷⁹. También describe pequeñas ramas de las fibras perivasculares que se visualizan en la capa más interna de la pared de los vasos y parece que hacen contacto con las células endoteliales y los pericitos, no encontrando terminaciones especiales en la pared del vaso como describieron BIETTI (1895a,b)^{5,6} y SALZMANN (1912)¹⁰⁶.

Finalmente describe la presencia de fibras en las proximidades de los melanocitos, sin afirmar una innervación específica.

Una vez realizada por WOLTER¹⁴⁸ esta primera descripción de la innervación corioidea humana con las técnicas argénticas, LYNETTE-FEENEY y HOGAN, en 1961a,b^{69,70}, realizan asimismo el primer estudio de la coroides humana con microscopía electrónica, observando ultraestructuralmente su innervación. Estos autores describen plexos, haces y fibras nerviosas aisladas, a través de todo el estroma corioideo con excepción de la coriocapilar, en contra de lo descrito por ROSSI (1936)¹⁰¹, MATTEUCCI (1949)⁷⁹ y el mismo WOLTER (1955)¹⁴⁸.

Los únicos nervios mielinizados se encuentran en la supracoroides y constituyen haces de aproximadamente de 150 fibras; estos nervios pierden progresivamente su vaina de mielina a medida que penetran en el estroma y se van ramificando para quedarse con una envoltura de citoplasma de células de Schwann, siendo esto característico de los nervios no mielinizados.

Los nervios del estroma corioideo serían no mielinizados, de aproximadamente 50 fibras, siendo más prominentes en la capa de los grandes vasos y sobre todo alrededor de las arterias. Los nervios de las capas más internas tendrían sólo dos o tres fibras nerviosas que se aproximan a los vasos sobre todo a las arterias y arteriolas.

Estos autores no pudieron demostrar contactos directos entre los axones y las fibras musculares lisas de la pared de los vasos, como demostraron en sus primeros trabajos BIETTI (1895a,b)^{5,6} y SALZMANN (1912)¹⁰⁶; sin embargo, en ocasiones demostraron que el axón pierde su cubierta de célula de Schwann quedando sólo separado de la membrana de la célula muscular lisa por su membrana basal. Aunque no había un verdadero contacto del axón con el sarcolema, sí se encontraban vesículas sinápticas abundantes en el axoplasma, que podían ser de dos tipos:

- grandes y densas, similares a los gránulos neurosecretorios de la neurohipófisis,
- y, vesículas pequeñas similares a las vesículas sinápticas de las uniones neuromusculares y terminaciones nerviosas del S.N.C. de los mamíferos.

Por último, y enlazando con la búsqueda de células nerviosas en la coroides, estudiaron los dos tipos de células más importantes que se pueden encontrar en la coroides, las células ganglionares y los melanocitos, y su relación con las fibras nerviosas. En sus preparaciones observaron que las células ganglionares son la estructura nerviosa más sobresaliente de la coroides, pueden tener uno o dos núcleos, y están rodeadas de doble membrana. Hay numerosas fibras nerviosas pequeñas,

desde 70 μm . de diámetro, siendo su tamaño promedio 0,5 μm ., que están en íntimo contacto con las células ganglionares produciendo frecuentemente profundas indentaciones en la membrana plasmática de la célula ganglionar. La fibra nerviosa puede estar separada de la célula ganglionar o por una delgada capa de citoplasma de célula de Schwann o por un espacio intercelular y sus respectivas membranas plasmáticas siendo el contacto más directo. Generalmente las fibras se sitúan en una sola cara de la célula ganglionar, agrupadas, quedando muy pocas en contacto con el resto de la superficie celular.

Demostrando la existencia de células ganglionares en la coroides humana con la microscopía electrónica ponen fin a la controversia sobre la existencia de las células ganglionares en dicha capa.

Finalmente los melanocitos también fueron observados en estrecha asociación con los nervios, tanto en la supracoroides como en el resto de las capas coroideas, se sitúan a lo largo de un haz nervioso o rodeándolo en sus ramificaciones. También se encontraban en los puntos nodales de los plexos nerviosos. El melanocito se separa de las fibras nerviosas por las membranas basales de ambos y una capa de citoplasma de la célula de Schwann del nervio; solamente en una ocasión se demostró con microscopía electrónica, el contacto entre un melanocito y una fibra nerviosa, separados sólo por sus respectivas membranas plasmáticas.

BEATIE y STILWELL, en ese mismo año (1961)³, estudiaron la innervación del ojo del conejo con azul de metileno postulando que la innervación corioidea se realiza sólo a expensas de los nervios ciliares largos. Todos los vasos corioideos, tanto arteriales como venosos, reciben innervación a través de esta vía; no encontrando aportaciones procedentes de los nervios ciliares cortos. Los nervios ciliares largos, en estrecha asociación con las arterias ciliares largas posteriores penetrarán en el globo ocular del conejo en la vecindad de la esclera, y desde la supracoroides se

ramifican para formar un sistema pararterial coroideo. A pocos milímetros de su entrada haces de fibras nerviosas de mediano tamaño abandonan el nervio ciliar principal y acompañan de forma paralela y cercana a las arterias a una distancia mayor de 1 mm. de su pared para formar este sistema pararterial. Pequeños haces de estos nervios rodean, envuelven y siguen a los vasos en una disposición plexiforme. De este sistema pararterial parten fibras individuales que llegan a inervar las fibras musculares lisas de la pared de los vasos, como ya postulaban BIETTI (1895a,b)^{5,6} y SALZMANN (1912)¹⁰⁶, constituyendo un sistema periarterial. En los puntos donde los vasos se ramifican, ramas nerviosas para y periarteriales acompañan a las ramas vasculares hijas, disminuyendo progresivamente el número de fibras nerviosas de los haces.

En la porción arteriolar los nervios estarán formados por haces de dos o tres fibras que corren de forma plexiforme a lo largo del vaso, coincidiendo con las observaciones al microscopio electrónico de LYNETTE-FEENEY y HOGAN (1961a,b)^{69,70}. Estos autores, sin embargo, no encuentran terminaciones nerviosas libres, ni células ganglionares. Apoyándose en esta observación y en que las fibras nerviosas están todas en relación con los vasos y son amielínicas, plantean su naturaleza vaso-sensorial.

Con el propósito de avanzar en el conocimiento de la inervación coroidea CASTRO-CORREIA en 1961¹⁸ realiza un amplio estudio en humanos y animales de experimentación (conejo, cobaya y ratón), utilizando tanto impregnaciones argénticas como la tinción azul de metileno.

Con ambas técnicas la coroides presenta una gran riqueza de elementos nerviosos. Describe un plexo nervioso coroideo único que ocupa todo el espesor coroideo que tiene tres estratos: superficial, medio y profundo, que se continúan unos con otros. El estrato medio presenta la malla más voluminosa y espesa, y el profundo

tiene menos fibras que los otros dos.

Las fibras nerviosas se ramifican desde el estrato superficial al profundo siendo cada vez más finas. En todos los estratos se pueden ver fibras aisladas. Los nervios de la zona posterior son los más gruesos y dan ramas más finas al dirigirse hacia delante. Los haces que forman los plexos son más o menos grandes en dependencia de la cantidad de fibras que tengan. Estas fibras siempre son axónicas y pueden tener distintos espesores en el mismo haz.

Coincidiendo con los trabajos de LYNETTE-FEENEY y HOGAN (1961a,b)^{69,70}, describe fibras mielínicas que se tiñen fuertemente por la plata, aunque la mayoría de las fibras coroideas serían amielínicas, estando rodeadas por un sincitio de células de Schwann.

En contra de lo descrito por BEATIE y STILWELL (1961)³ en el mismo año, y de acuerdo con ROSSI (1961)¹⁰¹, afirma que la inervación coroidea se realiza a expensas de los nervios ciliares cortos. Cada arteria ciliar posterior corta se acompaña de dos o más haces nerviosos que se sitúan en el tejido conjuntivo vecino a la adventicia de la arteria. Estos haces van describiendo el contorno del árbol arterial y constituyen la mayor parte de los troncos nerviosos coroideos. De estos haces parten fibras para el tejido conjuntivo estromal para los plexos vasculares vecinos y para la propia adventicia del vaso. Estas fibras adventiciales serían las más delgadas y tienen disposición espiroidea como ya describió MAWAS (1952)⁸⁴. En la capa profunda de la adventicia próxima a la capa muscular de la media se encuentran células intersticiales anastomosadas a las fibras nerviosas formando un sincitio neuroplásmico intramural.

En las venas las fibras adventiciales no formarán espiras y no hay nervios tan voluminosos como en las arterias. La inervación de arteriolas, vénulas y capilares es similar, junto a las paredes de estos vasos se ven células intersticiales cuyas prolongaciones siguen a las paredes de los vasos. Estas células forman parte del

sincitio neuroplásmico común a toda la coroides, al igual que las fibras nerviosas de estos vasos forman parte del plexo coroideo común.

Sin embargo, no observó ni neurofibrillas ni células intersticiales a nivel del epitelio pigmentario en contra de lo descrito por ROSSI (1936)¹⁰¹ y MATTEUCCI (1949)⁷⁹, en los primeros trabajos sobre inervación corioidea.

Además de las fibras, demuestra también la existencia de unas terminaciones nerviosas especiales:

- * Fibras terminales con una arborización reticular similar a una hoja.
- * Placas neurofibrilares donde se observan células nerviosas.
- * Terminaciones en forma de cordones planos, similares a los corpúsculos de Ruffini sin cápsula conjuntiva, sólo observadas en animales de experimentación.

Esta formas nerviosas que se describen como terminaciones sensitivas, estarían probablemente relacionadas con la sensibilidad térmica y de presión y podrían representar el punto inicial de un arco reflejo cuya terminación estaría en las células intersticiales que se disponen próximas a los elementos efectores tanto en la túnica muscular de los vasos ciliares cortos como en los melanóforos del sistema coroideo.

Por último, describió dos tipos celulares:

- 1.- Las células intersticiales que se unen por sus prolongaciones para formar un plexo sincitial a lo largo de toda la coroides entronando con los haces nerviosos terminales de los plexos coroides. Estas células se observaron con cuatro formas:
 - células intersticiales ramificadas
 - células en forma de largos cordones con el núcleo incluido,
 - células en forma de cordones plasmáticos con granulaciones argentófilas,

- células en forma de cordones plasmáticos con neurofibrillas.
- 2.- Células ganglionares, que fueron observadas en la coroides de todos los animales estudiados. En la coroides humana estas células eran multipolares con neurofibrillas en su citoplasma, núcleo claro y redondo, nucléolos prominentes, y prolongaciones axonales. Se situad a lo largo de toda la coroides en el estroma conjuntivo o en la vecindad de los vasos, aisladas o en grupos constituyendo microganglios. Pueden ser de distintos tamaños, en general, las de humano son mayores. Las de animales suelen ser unipolares y a veces bipolares.

Este mismo autor (CASTRO-CORREIA), en 1965¹⁹, realiza un nuevo estudio de las estructuras nerviosas del tracto uveal de humanos y animales de experimentación como el conejo, cobaya y rata, con técnicas argénticas.

En humanos describe en la coroides planos de estructuras nerviosas fibrilares que se asocian a células nerviosas, y planos sin aparente conexión con células ganglionares.

En la coroides de animales, observa la existencia de formaciones sensoriales que presentan dos aspectos característicos:

- * terminaciones de forma lanceolada o en llama, que en ocasiones se agrupan en dos o tres. Estas terminaciones sólo las había demostrado en humanos en sus trabajos previos (1961)¹⁸;
- * terminaciones en forma alargada o fusiformes, se puede observar una estructura espiral en su interior, las cuales no había descrito en sus primeros trabajos de 1961¹⁸.

Asimismo vuelve a demostrar la presencia de células ganglionares, tanto en la coroides de humanos como de animales de experimentación, con las mismas características que ya había descrito (1961)¹⁸.

Por último, CASTRO-CORREIA en 1967²⁰, completa sus trabajos previos utilizando de nuevo técnicas puramente morfológicas: el método del *carbonato de plata amoniacal de Jabonero* y el método del *azul de metileno de Schbadasch*, que ya utilizó en 1961¹⁸.

Describe la innervación uveal, tanto en humano como en conejo, cobaya, y rata, determinando por un lado las características regionales de la innervación de esta capa, y por otro sus características generales.

Dentro de las características regionales propias de la coroides estudia los plexos nerviosos coroides, las células ganglionares y las terminaciones nerviosas.

Con respecto a los plexos nerviosos, confirma nuevamente que la innervación corioidea es fundamentalmente vascular con predominio arterial. Los troncos nerviosos grandes de los nervios ciliares posteriores cortos siguen las ramificaciones arteriales de las arterias ciliares cortas, desde la vecindad de la cabeza del nervio óptico, hasta su terminación en la vecindad de las venas vorticosas, y desde la capa de los grandes vasos a la coriocapilar. Estas fibras nerviosas disminuyen de tamaño en su progresión posteroanterior y en profundidad y constituyen tres plexos bien diferenciados: un plexo externo, de nervios gruesos a nivel de la capa de los grandes vasos; un plexo medio formado por nervios más estrechos situados internamente a la capa de los grandes vasos; y por último, un plexo interno formado por nervios con pocas fibras que casi toca el epitelio pigmentario.

Con respecto a las células ganglionares, vuelve a observarlas, tanto en humano como en animales de experimentación, en contra de lo admitido por BIETTI (1895a,b)^{5,6}, ROSSI (1936)¹⁰¹, MATTEUCCI (1949)⁷⁹, BEATIE y STILWELL (1961)³. Estas células eran de mayor tamaño y multipolares en humanos; siendo más pequeñas y unipolares-bipolares en los animales de experimentación. Aparecían tanto aisladas como en grupos, formando microganglios, en relación con los vasos o sumergidas en el estroma sin tener relación con los mismos.

Con respecto a las terminaciones nerviosas, en la coroides describe terminaciones nerviosas motoras y sensitivas. Las motoras se encuentran entre las células musculares lisas de las arterias y las venas, o próximas a los cromatóforos, tanto en humanos como en el resto de los animales estudiados. Las sensitivas difieren entre el hombre y los animales. Así, en el hombre, se pueden encontrar los plexos neurofibrilares ya descritos por el autor que se relacionan con células ganglionares directamente y otras terminaciones nerviosas sin aparente relación con cuerpos celulares ganglionares que se conectan con una expansión fibrilar terminal de forma triangular. En la coroides de animales, vuelve a describir las terminaciones sensitivas elongadas como cuerpos fusiformes, dentro de los cuales se observa un material de forma espiral intensamente impregnado de plata. Por último, en la coroides de rata, observa además de estas formaciones espirales, terminaciones de forma lanceolada, a veces agrupadas en dos o tres, que ya había descrito en sus trabajos previos.

En cuanto a las características generales de la inervación uveal, describe la inervación vascular, la inervación de los cromatóforos y la organización del sistema nervioso autónomo periférico en el tracto uveal.

Con respecto a la inervación vascular, tanto con plata como con azul de metileno, describe cómo los nervios ciliares cortos definen claramente el patrón arterial; esto lo observa marcadamente en la coroides pero no es exclusivo de ella. A lo largo de toda la uvea observó la estrecha relación de las fibras nerviosas con la pared del vaso. De los 2 ó 3 nervios que siguen a cada vaso parten ramas continuamente que penetran en la adventicia formando un patrón helicoidal como ya describió MAWAS (1952)⁸⁴, ROSSI (1936)¹⁰¹ y él mismo, en sus trabajos previos^{18,19}.

Las fibras que forman las espirales en la pared de los vasos, están embebidas de citoplasma de células de Schwann como demuestra en sus preparaciones. Finalmente, ramas muy finas que parten de las espirales se sitúan entre las células

musculares de la capa media y parecen terminar ahí en pequeños puntos terminales. En los capilares observó células de Schwann a lo largo de sus paredes y en el citoplasma de las células se identifica una ó mas fibras nerviosas, confirmando la innervación capilar ya postulada por ROSSI (1936)¹⁰¹, MATTEUCCI (1949)⁷⁹ y WOLTER (1960)¹⁴⁸.

En cuanto a la innervación endotelial no observa ninguna fibra nerviosa que penetre en el citoplasma de las células. Terminaciones nerviosas de forma esférica se observan en la inmediata vecindad de las células pero nunca dentro; estas terminaciones podían corresponder a las terminaciones en forma de esfera descritas ya por BIETTI (1895a,b)^{5,6} y SALZMANN (1912)¹⁰⁶ a finales del siglo pasado y principios de este.

Con respecto a la innervación de los cromatóforos, en contra de lo que sucede con las células endoteliales, se pueden observar fibras nerviosas en el citoplasma de los cromatóforos. En alguna célula, estas fibras terminan de forma esferular, en otras, las fibras no tienen ninguna terminación o configuración especial al alcanzar el cromatóforo. Estas observaciones soportan la teoría de una posible innervación de los melanocitos de la uvea, coincidiendo con las observaciones con microscopía electrónica de LYNETTE-FEENEY y HOGAN (1961a,b)^{69,70}.

En este trabajo, CASTRO-CORREIA, también estudia la organización del Sistema Nervioso Autónomo Periférico en el tracto uveal. En todas las regiones de la úvea se pueden observar que los grandes nervios se acompañan de células de Schwann. A medida que estos nervios se van ramificando, los núcleos de las células de Schwann son más evidentes y, cuando los nervios llegan a ser haces de muy pocas fibras no solamente se observa el núcleo sino también el citoplasma de la célula de Schwann. Dado que las fibras nerviosas se ramifican y se anastomosan unas con otras y que todas ellas están rodeadas de células de Schwann, postula la teoría de que el Sistema Nervioso Periférico del tracto uveal estaría formado por una gran red

anastomótica constituida por un plasmodio de células de Schwann y las fibras nerviosas incluidas en el citoplasma de estas células.

Esta teoría también estaría de acuerdo con las observaciones al microscopio electrónico de LYNETTE-FEENEY y HOGAN (1961a,b)^{69,70}. Además, las células intersticiales discutidas en sus trabajos previos corresponderían a las células de Schwann, encontrando diferentes tipos de células en dependencia del nivel del corte estudiado.

Por último vuelve a incidir en la idea de que la innervación autonómica uveal es tanto sensitiva como motora.

1.2.2.- ESTUDIOS MEDIANTE TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS.

Las técnicas clásicas utilizadas por los diversos autores, como las impregnaciones argénticas con sus diversas modificaciones, y la inyección intravital del azul de metileno, sólo permitían el estudio morfológico de los nervios ciliares y su distribución anatómica dentro de la coroides. Todo esto unido a la dificultad de interpretación con estas técnicas dada su variabilidad, lleva a EHINGER en 1964²⁶, a introducir un nuevo método para el estudio de la innervación uveal. Este autor basándose en la técnica de FALCK y HILLARP (1962a,b,1965)^{37,38,39}, desarrolla un método histoquímico para detectar fibras de origen adrenérgico.

En los tejidos normales los nervios adrenérgicos desarrollan una fluorescencia específica con un tratamiento previo histoquímico, debido a la presencia en ellos de la noradrenalina que se convierte en la 3,4 dihidro-isoquinoleina, intensamente fluorescente. Basándose en esto, EHINGER²⁶ estudia la distribución de los nervios

adrenérgicos en las estructuras orbitarias del cobaya, conejo, gato, ratón y rata albina, encontrando a nivel de la coroides, fibras fluorescentes que están principalmente asociadas a los vasos, existiendo también una fina red de fibras varicosas que corren libres en el estroma.

Con este nuevo método, EHINGER²⁶, introduce un nuevo concepto en el estudio de la inervación uveal, el concepto anatómico-funcional de las fibras nerviosas. A partir de entonces los autores no solamente estudiaran la distribución de las fibras nerviosas sino también su posible origen adrenérgico o colinérgico del Sistema Nervioso Autónomo.

HAGGENDAL y MALMFORS (1965)⁵², utilizan de nuevo las técnicas de FALCK y HILLARP (1962a,b,1965)^{37,38,39}, para el estudio de la úvea del conejo normal, secundariamente a una ganglionectomía cervical superior, y por último después del tratamiento con drogas que interfieren en el almacenamiento de catecolaminas.

Al igual que EHINGER (1964)²⁶, en la coroides, demuestran una fluorescencia específica en fibras con varicosidades fuertemente fluorescentes, que se encontraban en relación con los vasos, próximas a la cara externa de la capa media de los grandes vasos y especialmente próximos a las arteriolas.

Estas fibras presentaban una apariencia similar a las fibras adrenérgicas que contienen noradrenalina en otros órganos.

Con la denervación que produce la ganglionectomía cervical superior desaparecen todas las fibras fluorescentes coroides. Todas estas determinaciones les llevaron a postular la existencia de una inervación vascular en la coroides de origen simpático.

MALMFORS y OLSON (MALMFORS, 1965⁷⁸; OLSON y MALMFORS, 1970⁹⁵), completan sus trabajos anteriores⁵², utilizando la misma técnica y ampliando su estudio a otras especies animales: ratón, cobaya, rata, gato y mono.

En la coroides confirma la inervación vascular adrenérgica y además describe unos axones adrenérgicos que no están en íntima relación con los vasos, y que ya habían sido descritas previamente por EHINGER (1964)²⁶. La inervación vascular adrenérgica consiste, según MALMFORS⁷⁸, en el típico plexo de crecimiento constituido por una delicada red ampliamente ramificada y bidimensional, cuyas fibras terminales, finas y con abundantes varicosidades intensamente fluorescentes, se localizan en el límite entre la adventicia y la capa muscular lisa de la media vascular.

Las terminaciones adrenérgicas no terminales corren en el tejido en pequeños haces nerviosos y generalmente son lisos y con débil fluorescencia.

Las fibras que no tienen íntima relación con los vasos fueron estudiadas sobre todo en la coroides de rata. También forman una red bidimensional bien desarrollada que se relaciona íntimamente con la capa capilar, estas fibras estaban ausentes en una estrecha zona en la parte mas anterior de la coroides.

Demuestra de nuevo la desaparición de todas las fibras tras la simpatectomía cervical superior, y el tratamiento con reserpina, confirmando por tanto el origen simpático de estas fibras.

EHINGER, 1966(a,b,c,d,e,1969)²⁷⁻³², publica de nuevo múltiples trabajos utilizando el método histoquímico de fluorescencia de FALCK y HILLARP (1962a,b,1965)³⁷⁻³⁹, tanto en humanos como en animales de experimentación diversos: rata, cobaya, hámster, conejo, ratón, gato, cerdo, perro, oveja y mono. En todos ellos confirma una vez más la existencia de fibras adrenérgicas en la coroides. La mayor parte de ellas son varicosas y se encuentran también en su mayoría

rodeando a los vasos. Estas fibras adrenérgicas alcanzan la coriocapilar y pueden ser vistas entre esta capa y el epitelio pigmentario, lo que concuerda con las observaciones primitivas de fibras intraepiteliales de ROSSI (1936)¹⁰¹, MATTEUCCI (1949)⁷⁹, y MAWAS (1952)⁸⁴.

Además en todos sus trabajos observa nuevamente la existencia de redes de estas fibras sin aparente conexión con los vasos, a nivel del estroma corioideo. En las preparaciones de cobaya y conejo, estas redes de fibras son más numerosas a nivel del área visual.

Por último, introduce en su trabajo la *técnica histoquímica de la tiocolina* para demostrar acetilcolinesterasa, que fue desarrollada por KOELLE (1962)⁵⁹, y modificada por *Holmstedt*. Esta técnica permite marcar las fibras colinérgicas que tienen acetilcolinesterasa, de una forma específica. Con ella, EHINGER²⁷⁻³², demuestra la presencia de fibras colinérgicas en la coroides, tanto de humanos como de animales de experimentación (rata, cobaya, conejo), en conexión con las arteriolas y libres en el estroma. Estas fibras, en relación con las arteriolas, podrían mediar los efectos vasodilatadores.

LATIES y JACOBOWITZ (1966)⁶⁴, en ese mismo año y utilizando también la técnica de FALCK y HILLARP (1962a,b,1965)³⁷⁻³⁹, estudiaron la inervación ocular del mono, gato y conejo, demostrando una vez más que la coroides presenta una malla difusa de inervación adrenérgica que se extiende hasta la coriocapilar, tanto central como periféricamente. Aunque las prolongaciones que mandan hacia delante los nervios ciliares largos tienen pocas fibras fluorescentes.

Una vez desarrolladas las técnicas histoquímicas para el marcaje de nervios adrenérgicos y colinérgicos en la coroides, RUSKELL (1971)¹⁰⁵ realiza un trabajo con microscopía electrónica para observar ultraestructuralmente la inervación

parasimpática coroidea. Para realizar este estudio utiliza monos normales, y posteriormente realiza denervaciones en el ganglio cervical superior, el ganglio pterigo-palatino, y el nervio petroso superficial mayor.

Este autor, ya en sus trabajos del año 1970^{103,104} establece la existencia de un patrón de fibras nerviosas parasimpáticas en el ojo del mono, que coexisten con las fibras parasimpáticas procedentes del III par. Estas fibras tendrían su origen en el nervio facial, harían sinapsis en el ganglio pterigopalatino y formarían parte del plexo autonómico retroorbitario; penetrarían en la órbita para posteriormente: parte de ellas unirse a los nervios ciliares largos, parte penetrar en la adventicia de las arterias ciliares, y por último, otras penetrar independientemente en el globo ocular en la vecindad del nervio óptico.

Basándose en estas afirmaciones estudia la distribución de estas fibras parasimpáticas en la coroides del mono, encontrando que hay dos tipos estructurales distintos de nervios de acuerdo con las observaciones al microscopio electrónico de LYNETTE-FEENEY y HOGAN (1961a,b)^{69,70}:

- nervios grandes mielinizados, que se situad sólo en la supracoroides y corresponden a ramas gruesas de los nervios ciliares
- nervios pequeños no mielinizados, que se situad en la mitad externa de la coroides, y son los más comunes.

En las capas más profundas de la coroides sólo se observan grupos pequeños o aislados de haces de fibras nerviosas, no encontrando ningún haz o fibra entre o más profundo a los vasos de la coriocapilar. Algunos haces parecen no tener relación con estructuras específicas de la coroides, otros se situad próximos a fibrocitos, y más comúnmente a los cromatóforos.

Casi todos los haces terminales contienen vesículas en varicosidades terminales o preterminales, en secciones longitudinales de una fibra nerviosa aislada terminal se ven varicosidades pero no se pueden identificar terminaciones nerviosas con certeza.

Las únicas grandes concentraciones de haces terminales se ven próximas a las células musculares de las arterias y arteriolas terminales. Los haces se situad próximos a la cara externa de la capa muscular, sus axones presentan varicosidades con vesículas que se orientan hacia la cara arteriolar del axon agrupándose. Estos haces son menos abundantes en las arteriolas terminales que en las arteriolas pero siempre hay uno o más haces en todas las secciones.

Los haces terminales asociados a venas y vénulas son pocos comparándolos con los de las arteriolas, pero se pueden ver regularmente, próximas a las paredes de los vasos y con numerosas varicosidades también conteniendo vesículas.

Es muy difícil ver fibras nerviosas terminales en la vecindad de la coriocapilar y, cuando se ven, se disponen cerca de la pared externa exclusivamente.

Las vesículas encontradas en las varicosidades terminales son de tres tipos:

- vesículas pequeñas y agranulares, presentes en todas las varicosidades
- vesículas pequeñas y granulares, presentes en el 12%, de origen simpático
- vesículas grandes y granulares, muy raras.

RUSKELL¹⁰⁵, al estudiar los tejidos que habían sido sometidos a distintas denervaciones, observó que tras la simpatectomía cervical superior, existía la persistencia de una alta densidad de fibras nerviosas terminales vasculares con varicosidades llenas de vesículas que nunca eran de tipo simpático. Esto le hizo postular la hipótesis de una segunda inervación motora que sería parasimpática teniendo su origen en el nervio facial. En opinión del autor, esta hipótesis se confirmaba por la gran proporción de vesículas granulares pequeñas simpáticas que aparecían en las terminaciones nerviosas tras el daño al ganglio esfenopalatino, y que coexisten con una reducción de las terminaciones parasimpáticas faciales a nivel corioideo. Asimismo, encontró cambios ultraestructurales muy claros en todos los

nervios no mielinizados coroideos y en sus terminaciones.

Con este trabajo intentó demostrar, que los nervios coroideos amielínicos eran fibras postganglionares parasimpáticas procedentes del nervio facial, que hacían su sinapsis en el ganglio esfenopalatino, y que junto con las fibras simpáticas, podrían regular la vasodilatación coroidea.

LATIES (1974)⁶⁵ utiliza de nuevo el método de la fluorescencia de FALCK y HILLARP (1962a,b,1965)³⁷⁻³⁹, para estudiar la innervación adrenérgica de los melanocitos uveales de la rata y el mono, en el recién nacido, a lo largo del desarrollo y por último en el adulto. En ninguno de los tres estadios y en ninguna de las dos especies pudo demostrar una innervación adrenérgica específica de los melanocitos ni en el iris ni en la coroides; sin embargo, pudo observar evidencias de innervación adrenérgica en el desarrollo de los melanocitos en ambos tejidos, gracias a la presencia de la enzima tirosinasa necesaria para la síntesis de melanina y la rápida disminución de su actividad tras la denervación simpática.

No obstante dada la naturaleza de las redes terminales autonómicas que no tienen forma específica, siendo la mayoría de ellas una fina red que se ramifica abundantemente en diferentes ángulos, es difícil determinar el íntimo contacto entre una fibra y un melanocito.

Por último, y de acuerdo con otros autores (HAEGGENDAL, 1965⁵²; EHINGER, 1964,1966a,b,c,d,e,²⁶⁻³¹; MALMFORS, 1965⁷⁸) que utilizaron esta misma técnica, describe que la innervación adrenérgica coroidea, tanto en el mono como en la rata, esta presente en relación con los vasos sanguíneos, nunca observando ninguna fibra nerviosa que atravesara la membrana de Bruch para innervar el epitelio pigmentario.

BERGMANSON (1977)⁴ realiza un nuevo trabajo con microscopía electrónica para estudiar la inervación oftálmica de la úvea del mono. Para ello realiza una denervación dañando el ganglio de Gasser o ganglio del trigémino (ó V par). Sus hallazgos en la coroides coinciden con los hallazgos de LYNETTE-FEENEY, y HOGAN (1961a,b)^{69,70} en su estudio con microscopía electrónica de la coroides humana.

Este autor observó que de la división oftálmica del V par sale una rama nasociliar que envía tres subramas al ojo: los dos nervios ciliares largos que entran directamente al ojo llevando fibras simpáticas, y la raíz sensitiva del ganglio ciliar cuyas fibras postganglionares entran al ojo con los nervios ciliares cortos.

Todas las partes de la úvea del mono estarían inervadas por estos nervios ciliares que se situad en la supracoroides dando ramas que desaparecen en el estroma coroideo.

Coincidiendo con las observaciones de RUSKELL (1971)¹⁰⁵, observó que los nervios coroideos no son necesariamente ramas de los nervios ciliares, sino que también están formados por fibras parasimpáticas de origen facial.

También describió, de acuerdo con estos autores, que los nervios coroideos pierden progresivamente su perineuro a medida que se van ramificando y van progresando en la profundidad del estroma coroideo; de tal modo, que están formados por fibras amielínicas que se situad fundamentalmente en la capa de los grandes vasos, llegando a ser pequeños grupos de fibras nerviosas rodeadas por un perineurium incompleto en la capa de pequeños vasos; además observó, fibras nerviosas aisladas tanto en supracoroides como en las capas de grandes y medianos vasos y ocasionalmente cerca de la coriocapilar. Asimismo describe las varicosidades terminales descritas por RUSKELL (1971)¹⁰⁵ con las vesículas de tres tipos y su frecuente relación con fibrocitos y melanocitos. No observa, por último, ninguna terminación específica ni sensitiva ni motora.

Tras la destrucción del ganglio oftálmico, demostró que existe una evidencia grande (del 90%) de degeneración de las fibras sensitivas de los nervios ciliares a nivel supracoroideo, siendo escaso las evidencias de degeneración en los nervios coroideos. Un pequeño número de axones normales, principalmente no mielinizados, se encontraron en los nervios examinados situándose en la periferia del nervio, estas fibras serían autonómicas y se unirían a las sensoriales distalmente a la lesión.

La observación frecuente de terminaciones nerviosas con vesículas pequeñas y granulares, le permitió suponer que estas fibras correspondían a la inervación simpática uveal procedente de otra vía.

Dadas las escasas evidencias de degeneración encontradas en la inervación propiamente coroidea, este autor postula que las fibras de origen oftálmico que se ramifiquen desde los nervios ciliares en la coroides son muy pocas e incluso podrían ser discontinuas.

Por último describe la existencia de células ganglionares en coroides que por la presencia de sinapsis podrían ser motoras.

KIRBY y col. (1978)⁵⁸ utilizan de nuevo las técnicas de fluorescencia para estudiar la inervación adrenérgica del iris y coroides de gallina en su desarrollo. Describen un grupo de células ganglionares intensamente fluorescentes en la coroides adyacente al cuerpo ciliar. Estas células serían bipolares en el momento del nacimiento, siendo multipolares hacia el día 12 del desarrollo de la gallina. Presentan procesos fluorescentes grandes formando un plexo en el interior de la coroides. Los axones que forman el plexo tienen las varicosidades características de los nervios adrenérgicos ya descritos previamente con esta técnica. Este plexo se interrumpe bruscamente en la unión de la coroides con el cuerpo ciliar. Estos autores postulan que estas células representarían un ganglio terminal simpático que recibiría impulsos preganglionares desde las fibras simpáticas del plexo carotideo.

FUKUDA (1979)⁴⁴ también utiliza la *técnica de fluorescencia de Falck-Hillarp*³⁷⁻³⁹, para estudiar la innervación de los vasos sanguíneos coroideos de la rata, encontrando fibras fluorescentes con abundantes varicosidades típicamente adrenérgicas que rodean a los vasos sanguíneos. Esta fluorescencia se sitúa específicamente alrededor de las arteriolas donde hay una densa red de varicosidades. Este plexo catecolaminérgico o simpático se originaría en el ganglio cervical superior y dada su disposición alrededor de los vasos, propone un papel regulador de las catecolaminas en la circulación sanguínea coroidea.

FUKUDA y MATSUSAKA (1980)⁴⁵ realizan un nuevo estudio con microscopía electrónica y técnicas de fluorescencia de las fibras nerviosas simpáticas en la coroides de rata, demostrando que las fibras simpáticas fluorescentes aparecen a través de toda la coroides, en algunos sitios a distancia de los vasos sanguíneos y en otras en contacto directo con la pared del vaso formando un verdadero rosario de varicosidades en la misma. Estas fibras formarán parte de los nervios ciliares coroideos. Estarían rodeadas por una delgada franja de citoplasma de células de Schawnn en la proximidad de los vasos, para después de recorrer una cierta distancia, convertirse en fibras nerviosas desnudas perivasculares.

Por último describen ocho tipos diferentes de terminaciones nerviosas en dependencia de sus elementos subcelulares.

MATSUSAKA (1981)⁸⁰, estudia de nuevo al microscopio electrónico, la innervación adrenérgica de la circulación coroidea en la rata albina adulta, utilizando la inyección de 5,6 dihidroxitriptamina. Este compuesto produce la liberación en las vesículas simpáticas de la 5 hidroxitriptamina y de sus derivados. De los ocho tipos morfológicos de terminación nerviosa coroidea por él descrito, sólo los tipos 4, 5 y 6 contenían vesículas granulares que podían ser grandes o pequeñas. Tras la

administración de 5,6 dihidroxitriptamina demuestra un aumento marcado de la densidad del contenido de las vesículas y de la membrana limitante en estos tres subtipos, postulando que estas terminaciones nerviosas pertenecerían al sistema nervioso adrenérgico o simpático.

Por último, este mismo autor en 1982⁸¹, completa sus trabajos sobre innervación coroidea realizando de nuevo un estudio con microscopía electrónica de la innervación coroidea en ratas adultas y humano, haciendo hincapié en la problemática de la innervación de los melanocitos coroides. En este estudio pone de manifiesto que los nervios ciliares hacen contacto verdadero con los melanocitos, siendo algunos de estos contactos de naturaleza sináptica. Demuestra que el interespacio entre el axón y el melanocito es de aproximadamente 30-70 nm. de ancho; las terminaciones sinápticas contienen vesículas con el core claro y vesículas con el core denso. Estas terminaciones nerviosas en contacto próximo con los melanocitos fueron observadas cerca de la coriocapilar y en dicha capa. Apoyándose en esta distribución, MATSUSAKA⁸¹ postula la teoría de que los melanocitos podrían formar una red de soporte para los capilares de la coriocapilar, siendo controlada esta función por los nervios ciliares.

SUGITA y YOSHIOKA (1984)¹²⁸ completan el trabajo de MATSUSAKA (1982)⁸¹ sobre la innervación de los melanocitos coroides, realizando ganglionectomías cervicales superiores en el conejo pigmentado. Estos autores observaron, en las coroides denervadas, axones degenerados que probablemente eran adrenérgicos; apareciendo a los dos o tres meses de la denervación grandes evidencias de degeneración en los melanocitos. Basándose en estas observaciones, apoyan la teoría de MATSUSAKA de la posible innervación adrenérgica de los melanocitos coroides.

GLUGLIELMONE Y CANTINO (1982)⁴⁹, realizaron un trabajo sobre la innervación adrenérgica de la coroides de gallina al microscopio óptico y al electrónico. Para realizar el estudio al microscopio electrónico utilizan de nuevo las técnicas de fluorescencia ya utilizadas por EHINGER (1964,1966a,b,c,d,e)²⁶⁻³¹, HÄGGENDAL (1965)⁵², MALMFORS (1965)⁷⁸, y LATIES (1966)⁶⁴, para el estudio de la innervación ocular adrenérgica en mamíferos inferiores y superiores, y por KIRBY y MATTIO (1978)⁵⁸ para el estudio de la de gallina.

Coincidiendo con estos trabajos, estos autores demuestran que los axones adrenérgicos forman en la coroides un plexo perivascular en la muscular de las arterias. Además de este plexo describen otro plexo intervacular que se conecta con el anterior, que ya había descrito WOLTER (1960)¹⁴⁸ con las técnicas de plata. Las fibras del plexo perivascular proceden de los plexos perivasculares del sistema carotideo que alcanzan la arteria oftálmica distribuyéndose en la capa vascular corioidea acompañando a las arterias ciliares posteriores cortas. El plexo intervacular estaría formado por las ramas corioideas de los nervios ciliares largos y por las ramas de los nervios ciliares cortos.

Los nervios ciliares largos a medida que corren en su progresión hacia el ecuador del globo dan en la supracoroides una o varias ramas delgadas que penetran en la coroides y se dividen en sus capas vasculares. Los nervios ciliares cortos que proceden del ganglio ciliar penetran en el globo acompañando a las arterias ciliares cortas posteriores; se dividen en pequeños haces nerviosos paralelos u oblicuos a las ramas de las arterias ciliares cortas. Los haces más delgados de estos nervios penetran y se dividen en el estroma de las capas vasculares corioideas; sus ramas finales formarían el plexo intervacular junto con un pequeño número de axones procedentes del plexo periarterial.

Con las técnicas de fluorescencia al microscopio óptico describen un plexo denso de fibras varicosas e intensamente fluorescentes alrededor de las ramas

arteriales coroideas de mediano y gran tamaño, y menos denso alrededor de las venas. Estos plexos no dan ramas anastomóticas para las fibras de los plexos intervasculares y no se encuentran fibras adrenérgicas en los capilares de la coriocapilar, en contra de las observaciones de WOLTER (1960)¹⁴⁸. En la supracoroides los troncos de los nervios ciliares contienen un cierto número de fibras adrenérgicas fluorescentes; los haces de fibras adrenérgicas que salen de estos troncos penetran en la capa vascular y corren paralelos o transversales con respecto a los vasos de menor tamaño. Estos haces se disocian en fibras aisladas fluorescentes que forman una extensa malla de plexos intervasculares sobre los vasos. Desde estos plexos fibras varicosas se distribuyen en la pared de los vasos o en el estroma intervascular donde terminan. También detectaron pequeñas neuronas fluorescentes aisladas o en grupo en las capas vasculares de los sectores anteriores coroideos. Sus prolongaciones pertenecen a los plexos nerviosos intervasculares. Así mismo observaron pequeñas células estrelladas con gran fluorescencia con una o más prolongaciones lisas que se situad entre las terminaciones nerviosas más finas de los plexos intervasculares próximas a los plexos terminales perivasculares.

Coincidiendo con los trabajos de LYNETTE-FEENEY y HOGAN (1961a,b)^{69,70}, la microscopía electrónica demuestra que los nervios ciliares tienen grupos de delgados axones no mielinizados junto a axones de mediano y gran tamaño mielinizados que se derivan de las neuronas del ganglio ciliar. Los troncos nerviosos paravasculares se componen de axones no mielinizados solos o en haces y ocasionalmente de axones mielinizados. Finalmente grupos de axones no mielinizados se pueden ver en delgados haces en el estroma intervascular.

En el estroma intervascular además de los axones, vuelven a observar a M.E. una extensa red de células musculares lisas, que ya habían observado a microscopía óptica. Son células estrelladas dispuestas entre las arterias y venas de las capas vasculares coroideas. Estas células no habían sido encontradas ni en humanos ni en

otros mamíferos en los anteriores estudios con M.E. de la coroides. Así mismo observaron que los axones amielínicos aislados o en haces se situaban próximos a estas células. Las varicosidades de estos axones contienen vesículas granulares de 40-60 nm. de diámetro próximos a la membrana plasmática de la célula muscular. También había axones mielinizados próximos a las células musculares con vesículas granulares. Algunas de estas vesículas son las características vesículas adrenérgicas con el core denso. Estas varicosidades también se observaron en los axones amielínicos terminales, de los plexos perivascuales próximos a la capa muscular de la pared arterial. No se observaron haces de axones ni varicosidades en la coriocapilar. Después de la gangliosectomía cervical superior las fibras fluorescentes casi desaparecen y aparecen cambios degenerativos en los axones próximos a ambos grupos de células musculares lisas vasculares e intervascuales. Estos hallazgos sugieren que los axones adrenérgicos perivascuales o intervascuales derivarían todos del ganglio cervical superior o pasarán a través de ese ganglio. La presencia tras la gangliosectomía de axones del sistema intervacular procedentes de los nervios ciliares sugiere la existencia de una doble inervación adrenérgica y colinérgica de la coroides.

NUZZI y col. (1992)⁹⁴ realizan un estudio de la inervación adrenérgica de la coroides humana; utilizando la clásica *técnica de fluorescencia de Falck y Hillarp* (FALCK, 1962a,b,1965)³⁷⁻³⁹ modificada para el estudio de montajes planos. En su trabajo confirman, como ya había demostrado en la coroides de gallina GUGLIELMONE (1982)⁴⁹, que las fibras postganglionares simpáticas alcanzan la coroides en el humano por tres vías:

- como fibras de los plexos perivascuales de las arterias ciliares cortas posteriores,
- como fibras de los plexos paravascuales satélites de dichas arterias,

- y por último formando parte de los nervios ciliares largos y cortos.

Todas estas fibras atraviesan la supracoroides sin forman un verdadero plexo, donde se encuentran fibras varicosas moderadamente fluorescentes; y es a nivel de las capas vasculares donde observan un plexo perivascular de fibras varicosas denso y extenso que se distribuye en las capas de los grandes y medianos vasos, estando ausente en la coriocapilar. Asimismo postulan que las fibras adrenérgicas vasculares tendrían una función vaso-reguladora en el sistema arterial, teniendo escaso papel regulador en el venoso ya que solamente las venas vorticosas y las de gran calibre presentan fibras adrenérgicas en un número muy reducido.

A diferencia de la coroides de gallina, en la coroides humana no pueden demostrar neuronas empleando estas técnicas. Sin embargo, también como en la gallina, demuestran en el humano células musculares lisas estrelladas e intensamente fluorescentes que contienen vesículas granulares. Estas células se encuentran tanto aisladas como en grupos y se situad próximas a las fibras adrenérgicas terminales peri e intervasculares; sugiriendo que serían elementos endocrinos liberadores de catecolaminas en los espacios intervasculares y en la circulación local.

Por último, observan numerosos melanocitos estrellados con sus ramificaciones paralelas a las paredes vasculares. Próximas a estas ramificaciones se encuentran fibras nerviosas intervasculares, demostrando numerosos puntos sinápticos entre éstas y los melanocitos. Apoyándose en esto, estos autores postulan el posible control nervioso de los melanocitos.

Finalmente, FLÜGEL-KOCH y col. (1994a,b)^{40,41}, realizan un estudio de la innervación coroidea en la rata, conejo, cerdo, gato, monos y humano, utilizando la técnica *histoquímica de la NADPH-diaforasa*, enzima que se encuentra en las neuronas cerebrales y del Sistema Nervioso Periférico.

Tanto en la rata como en el conejo, demuestran la existencia de un gran número de fibras nerviosas en el estroma corioideo. Los haces de fibras más prominentes se situad próximos a las arterias ciliares posteriores y a sus principales ramas. Estos haces se ramifican siguiendo la arborización de los vasos arteriales corriendo paralelos a las arterias y arteriolas; continuamente dan axones que abandonan el haz y se unen a la red nerviosa perivascular. Esta red de fibras, tanto para como perivascular, es mucho más densa y regular en la rata que en el conejo. En ninguna de las dos especies demuestran fibras NADPH-diaforasa positivas en la coriocapilar.

También, en ambas especies, demuestran la existencia de células ganglionares; de una a cuatro en la rata, y aproximadamente 20 en el conejo. Estas células se situad adyacentes a las arterias ciliares largas posteriores, son redondas u ovales y de aproximadamente de 5 a 8 μm . de diámetro en las dos especies. En la rata, sus axones se unen a los axones de los haces de fibras nerviosas, y en el conejo además de la localización adyacente a las arterias ciliares también se pueden observar en la periferia corioidea.

Asimismo, en la coroides de cerdo, gato y mono, demuestran haces de fibras NADPH-diaforasa(+) que corren paralelas a las arterias y arteriolas. De estos haces parten fibras individuales que forman redes alrededor de la pared de los vasos; estas redes perivascuales son más densas en las principales ramas de las arterias ciliares alrededor del territorio del nervio óptico, llegando a ser escasas junto a la ora serrata.

Sin embargo, solamente pueden demostrar células ganglionares NADPH-diaforasa(+) en la coroides del mono, estando prácticamente ausentes en el gato y cerdo. Estas células se situad sobre todo en los cuadrantes temporales corioideos, son multipolares pudiéndose encontrar aisladas o en grupos

Por último, en la coroides humana, también demuestran los haces de fibras para y perivasculares NADPH-diaforasa(+), que forman una delicada red de axones y varicosidades terminales, menos densa y regular que en la rata y el conejo. Además la distribución de estas fibras en el hombre, presenta diferencias regionales significativas; la mayoría de haces de fibras se situad en la región central debajo de la mácula, en contraste con la periferia donde casi no hay fibras. Pero la mayor diferencia con las especies inferiores es la presencia de numerosas células ganglionares NADPH-diaforasa(+). Estas células son poligonales con diámetros de 10-40 μm , y se encuentran aisladas o en grupos de 2 a 10 células; la mayor parte de ellas se localizan próximas a la pared de las arterias coroideas, nunca encontrándose en la coriocapilar. Grupos de células se conectan con grupos vecinos por axones NADPH-diaforasa(+), estos axones no tienen conexiones aparentes con las fibras perivasculares; sin embargo, en ocasiones se observaban axones delgados que partiendo de los axones de conexión se unen a las fibras perivasculares. También estas células ganglionares posee diferencias regionales en su distribución, así el mayor número de células (aproximadamente 1000) y las más grandes (20-40 μm . de diámetro) se encontraban próximas a la fóvea, mientras que entre los restantes territorios coroideos sumarían aproximadamente otras 1000 disminuyendo el número y el tamaño hacia la periferia. La diferencia de tamaño entre regiones era más marcada en los individuos mayores con respecto a los jóvenes, encontrándonos en los mayores las células de mayor tamaño por un acumulo de lipofuschina en las proximidades de la fóvea. La presencia de células ganglionares en el mono y el humano en la zona subfoveal y la ausencia de esa densa red en el conejo, rata, gato y cerdo, que asimismo carecen de fóvea (NICKEL, 1992)⁹⁰, podría sugerir el posible papel regulador de estas neuronas que serían las responsables de un reflejo vasodilatador rápido importante en la fóvea. Así, estas células ganglionares regulando el volumen coroideo podrían cambiar el grosor de la coroides influyendo en la

posición de la fovea central y por tanto en la agudeza visual. Asimismo, el envejecimiento de estas neuronas, demostrado por el aumento de lipofuschina en su citoplasma, ocurriría primero en la región central de la coroides (subfovea) donde se han encontrado las células de mayor tamaño indicando el posible papel de la luz en el envejecimiento neuronal subfoveal.

1.2.3.- ESTUDIOS DE LA INERVACIÓN COROIDEA MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS.

1.2.3.1.- Conceptos generales sobre las técnicas inmunohistoquímicas.

UDDMAN y col. (1980)¹⁴⁰ realizan un gran avance dentro de la investigación de la inervación ocular al introducir las técnicas inmunohistoquímicas.

Los primeros trabajos sobre inervación ocular fueron puramente morfológicos dado que las técnicas utilizadas en ellos, como impregnaciones argénticas e inyecciones intravitales de azul de metileno, no permitían ningún estudio funcional o morfológico. Esta característica, unida a la inconstancia de resultados obtenidos con las impregnaciones metálicas (TOLIVIA, 1975¹³⁷), llevó a la utilización de la microscopía electrónica para obtener unos resultados más uniformes.

Estos primeros trabajos fueron ampliados gracias a la aplicación de las técnicas histoquímicas fluorescentes basadas en los trabajos de FALCK y HILLARP (1962a,b,1965)³⁷⁻³⁹, que permitían determinar la naturaleza de las terminaciones adrenérgicas o colinérgicas, pero hasta la introducción de la inmunohistoquímica no

se había podido estudiar con especificidad la naturaleza de las terminaciones nerviosas coroideas.

Estas nuevas técnicas se basan en el método desarrollado por *Coons* y sus colaboradores en 1941 (ESQUERDA, 1991³⁵). Estos investigadores decidieron aprovechar la increíble especificidad de los anticuerpos para la localización histoquímica. Pensaron que si obtenían un anticuerpo específico dirigido contra una determinada sustancia, esta sería la mejor manera de localizar en un tejido dicha sustancia. Como los anticuerpos (Ac.) no son visibles por sí solos en el microscopio, marcaban los Ac. con una sustancia, el isocianato de fluoresceína, que aunque por sí mismo no es visible, al ser excitado por la luz ultravioleta emite una luz verde amarillenta que es claramente visible al microscopio.

Al ser la fluoresceína electrónicamente lúcida, estas técnicas inmunofluorescentes no pueden utilizarse para la microscopía electrónica por lo que NAKANE y PIERCE (1966)⁸⁹ aportaron una solución al problema de la localización ultraestructural, desarrollando un método inmunoenzimático. Estos autores idearon conjugar los Ac. con una enzima y demostrar luego la presencia de la enzima usando un sustrato adecuado. Después de utilizar varios enzimas seleccionaron la peroxidasa vegetal.

Esta técnica es modificada en 1970 por STERNBERGER¹¹⁷, al introducir un método para poner de manifiesto esta enzima, la técnica de la peroxidasa antiperoxidasa. Este método se basa en la unión de un antígeno tisular con un anticuerpo obtenido específicamente contra éste en un determinado animal huésped, a este Ac. se le denomina anticuerpo primario (Ac.1); a su vez, se obtiene un anticuerpo secundario (Ac.2) mediante la inyección de proteína del animal huésped

en otra especie diferente; por último, se obtiene el anticuerpo terciario (Ac.3) o complejo peroxidasa anti-peroxidasa (P.A.P.), éste se consigue ligando peroxidasa a un anticuerpo contra peroxidasa desarrollado en el primero de los animales huéspedes. La P.A.P. se unirá por lo tanto al Ac.2 poniéndose de manifiesto mediante la adición de un cromógeno, generalmente 3,3-diaminobencidina (D.A.B.) que reacciona con la P.A.P. El antígeno puede observarse así mediante el microscopio óptico.

1.2.3.2.- Estudios inmunohistoquímicos de la innervación coroidea mediante el empleo de diferentes marcadores.

Siguiendo estas técnicas varios han sido los autores que las han empleado para el estudio de la innervación uveal en las dos últimas décadas.

Dentro de ellos encontramos dos grupos:

A.- Estudios mediante técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos frente a neuropéptidos.

B.- Estudios mediante técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos frente a filamentos intermedios.

* Proteína gliofibrilar ácida (PGFA)

* Neurofilamentos (NF)

A.- Estudios con anticuerpos frente a neuropéptidos.

Basándose en las técnicas inmunohistoquímicas y en la demostración con las mismas de una serie de sustancias que se marcaban tanto en el S.N.C. como en las

terminaciones del S.N.P., son varios los autores que utilizan estas técnicas para estudiar la innervación coroidea.

Estas sustancias llamadas neuropéptidos, por su naturaleza proteica y su localización en el sistema nervioso, son fundamentalmente el neuropéptido Y (NP-Y), la sustancia P, y el péptido vasoactivo pancreático (VIP).

Otros péptidos, también demostrados en las terminaciones nerviosas y estructuras ganglionares, tanto del S.N.C. como del S.N.P., que han sido menos utilizadas por los diferentes autores, pero que también sirven para el marcaje de las terminaciones nerviosas coroides son el polipéptido pancreático (PP), el péptido del gen liberador de calcitonina (CGRP), la galanina y la somatostatina.

Se inicia de esta forma una nueva etapa en el estudio de la innervación uveal, siendo varios los autores que utilizando anticuerpos frente a estos neuropéptidos presentes en el S.N.P., tratan de demostrar las terminaciones nerviosas coroides marcando dichas sustancias.

*** El péptido vasoactivo intestinal (VIP) como marcador de las fibras nerviosas coroides.**

El VIP es un péptido compuesto de 28 aa. que fue aislado inicialmente en el intestino delgado por LARSSON y col. (1976)⁶³, siendo identificado posteriormente en el cerebro y las neuronas periféricas por varios autores (LARSON, 1976⁶³; LUNDBERG, 1979b, 1985)^{74,77}.

Basándose en la localización del VIP en las neuronas periféricas del Sistema Nervioso Autónomo, varios autores han utilizado anticuerpos frente a este neuropéptido para estudiar la innervación coroidea.

Así, UDDMAN y col. en 1980¹⁴⁰ utilizan el VIP para el estudio de la innervación ocular y orbitaria del gato. Estos autores, describen la presencia de fibras nerviosas con inmunorreactividad VIP(+) alrededor de los vasos de pequeño y mediano calibre en la coroides, estando ausente esta señal en la úvea anterior.

Las arteriolas coroideas de mediano tamaño (100-150 μ m.) estaban rodeadas de terminaciones nerviosas con inmunorreactividad VIP(+), las arteriolas de menor diámetro, las venas y la coriocapilar no tenían terminaciones detectables.

También buscaron la inmunorreactividad VIP(+) en los diferentes ganglios implicados en la innervación ocular, encontrando abundantes cuerpos neuronales con señal VIP(+) en el ganglio esfenopalatino, muy pocos en el ganglio cervical superior, y totalmente ausentes en el ganglio ciliar.

Tras la extirpación del ganglio esfenopalatino desaparecían todas las terminaciones VIP(+) de las estructuras oculares, mientras que tras extirpar el ganglio cervical superior y el ciliar no hubo cambios. Esto les induce a pensar que todas las terminaciones nerviosas oculares con inmunorreactividad frente al VIP derivan del ganglio esfenopalatino.

Por último, realizaron estímulos del III par a nivel intracraneal y del nervio facial, observando una vasodilatación coroidea que era mucho más pronunciada y duradera por estímulo del facial que por el del motor ocular común. En el iris, esta vasodilatación estaba ausente. Apoyándose en esto, postulan que la vasodilatación coroidea podría ser mediada por el VIP tras el estímulo del nervio facial, mientras que los efectos vasodilatadores producidos por estímulo del III par podrían ser debidos a una coestimulación del nervio vidiano próximo o a ciertas conexiones entre

el motor ocular común y el ganglio esfenopalatino. Por todo esto, los autores sugieren que los nervios VIP(+) parecen pertenecer al sistema parasimpático.

UNGER y col. (1981)¹⁴¹, apoyando los trabajos de UDDMAN (1980)¹⁴⁰ estudiaron los niveles de VIP en ojos de conejos normales y, conejos previamente denervados por extirpación del ganglio de Gasser (V par). Los niveles de VIP detectados fueron muy altos y no se vieron afectados por la denervación, siendo prácticamente similares en ojos normales y denervados. Estos hallazgos les llevan a postular que el VIP al no verse afectado por la denervación sensitiva no parecería asociado al sistema sensorial.

SHIMIZU (1982)¹¹² utiliza las técnicas inmunohistoquímicas para demostrar terminaciones nerviosas en la úvea de la rata, de la ardilla y del gato, con anticuerpos contra el VIP. Coincidiendo con los trabajos de UDDMAN (1980)¹⁴⁰ y UNGER (1981)¹⁴¹, encuentra una gran cantidad de fibras VIP(+) en la coroides, donde encuentra la mayor proporción de fibras VIP(+) del ojo.

TERENGHI y col. (1982)¹³², vuelven a emplear este anticuerpo para estudiar inervación uveal del cobaya, tanto al microscopio óptico como al electrónico. Basándose en el posible origen colinérgico de las fibras VIP, también utilizaron anticuerpos frente a la acetil-colinesterasa, enzima que se encuentra en las fibras colinérgicas. Este estudio fue completado con denervación tras extirpación del ganglio de Gasser, y bloqueo neuronal de transmisores con colchicina.

Estos autores demostraron, coincidiendo con los trabajos previos de UDDMAN (1980)¹⁴⁰, UNGER (1981)¹⁴¹ y SHIMIZU (1982)¹¹², una extensa red de fibras nerviosas varicosas VIP(+) rodeando y delimitando los vasos sanguíneos a través de toda la coroides. También observaron fibras finas y dispersas en la

supracoroides, no encontrando ningún cuerpo celular neuronal VIP(+) en la úvea posterior.

Asimismo, en la coroides la actividad acetil-colinesterásica estaba localizada en haces de fibras asociadas a los vasos sanguíneos con una localización casi coincidente con la de las fibras con inmunorreactividad VIP(+). Algunas células ganglionares con positividad acetil-colinesterásica fueron encontradas aisladas o en pequeños grupos.

Con la microscopía electrónica convencional encontraron dos tipos de nervios:

- nervios tipo P, que se caracterizan por presentar vesículas grandes con el núcleo denso, separadas de su membrana limitante por un halo de diámetro variable, y un número variable de vesículas pequeñas y agranulares. Estos nervios presentan una distribución idéntica a la de las fibras nerviosas marcadas con VIP, siendo especialmente numerosas alrededor de las arteriolas coroideas. Su ultraestructura se corresponde con la de los nervios colinérgicos.
- nervios que contienen vesículas pequeñas y granulares que se corresponden con la ultraestructura de los nervios adrenérgicos y, fueron localizados tanto en el iris como en la coroides. Estos nervios se encontraban en los mismos haces que los nervios tipo P, sobre todo alrededor de los vasos sanguíneos.

Ampliando la microscopía electrónica convencional con las técnicas inmunohistoquímicas, comprobaron que el VIP se encontraba en las vesículas grandes con core denso, típicas de los nervios tipo P o colinérgicos. En la coroides las terminaciones nerviosas con inmunorreactividad VIP(+) se encontraban en pequeños haces nerviosos de 5-10 fibras alrededor de las arteriolas coroideas, separadas de su pared por un espacio de 200 nm. Su distribución corresponde a la de las fibras tipo P descritas con la microscopía electrónica convencional, y existe una fuerte

asociación entre ellas y las células musculares de las arteriolas coroideas, aunque no se pudieron demostrar uniones neuromusculares.

Por último, tras la extirpación del ganglio de Gasser, las fibras coroideas con inmunorreactividad VIP(+) no experimentaron variación ni en su número, ni en la positividad de su tinción; en cambio, tras el tratamiento con colchicina disminuía el número de fibras VIP(+) ligeramente y aparecieron cuerpos neuronales con inmunorreactividad VIP(+) asociadas a las fibras VIP(+), postulando que esto podría deberse a que las células ganglionares al estar bloqueadas por la colchicina se cargan de neurotransmisores y son más susceptibles a la inmuno.

Completando los trabajos en animales de experimentación realizados con Ac. marcadores del neuropéptido VIP, MILLER y col. (1983)⁸⁵ estudian la innervación de la coroides humana utilizando este Ac.

Con esta técnica demuestran que la coroides humana presenta una extensa innervación de fibras nerviosas con inmunorreactividad VIP positiva que se sitúa predominantemente en el estroma corioideo. los 10 ó 12 nervios ciliares que entran en la coroides en la vecindad del nervio óptico tienen 100 a 200 fibras nerviosas con inmunorreactividad VIP(+), se dirigen hacia adelante estrechándose hasta 90-30 μm . de ancho en la coroides anterior. Frecuentemente dan ramas pequeñas de 20-50 μm . que se dividen repetidamente en el estroma corioideo que contienen de 5-15 fibras nerviosas VIP(+), partiendo de estas ramas hay fibras nerviosas aisladas que se ramifican ocasionalmente y se observan como terminaciones libres en el estroma. Además de estas ramas procedentes de los nervios ciliares las arterias ciliares que entran en la coroides posterior tienen una densa innervación perivascular de fibras nerviosas con inmunorreactividad VIP(+). Estas fibras perivasculares se van ramificando siguiendo a las arterias hasta detenerse a nivel de los vasos sanguíneos de 80 μm . de diámetro. Algunos vasos sanguíneos de este tamaño, presumiblemente

venas, no presentan inmunorreactividad VIP(+). Esta inervación perivascular de fibras VIP(+) ya había sido descrita en animales de experimentación.

Además de estos nervios perivascuales, MILLER y col.⁸⁵, observaron que los vasos sanguíneos son frecuentemente seguidos por haces pequeños de fibras VIP(+) que a menudo se anastomosan con las fibras perivascuales; son los llamados haces paravascuales ya descritos por GUGLIELMONE y CANTINO (1982)⁴⁹ en la coroides de gallina con fluorescencia. Los pequeños haces de fibras nerviosas VIP(+) que parten como ramas de los nervios ciliares se unen tanto a los nervios perivascuales como a los paravascuales.

También observaron que las venas grandes que convergen en la ampolla, en el origen de las vorticosas, tienen asociado un gran número de fibras con inmunorreactividad VIP(+) en contra de lo descrito por TERENCEHI (1982)¹³².

Asimismo encontraron que los haces nerviosos VIP(+) en el estroma corioideo se sitúan longitudinalmente desde el polo posterior hacia el ecuador del globo; sin embargo, en el borde anterior de la coroides próximo al cuerpo ciliar, los haces con inmunorreactividad VIP(+) se sitúan circunferencialmente sugiriendo un cambio en la inervación. En el estroma corioideo anterior los haces de fibras VIP(+) entre 5-20 μ m. forman un plexo poco denso de fibras varicosas que corre paralelamente a los vasos y se ramifica y anastomosa. De este plexo parten fibras nerviosas aisladas que se dividen varias veces antes de terminar como terminaciones libres lo que ocurre frecuentemente en este área.

De las fibras del estroma corioideo, parten escasos haces de fibras pequeñas y fibras nerviosas aisladas, para inervar a la supracoroides, en forma de terminaciones libres, después de ramificarse varias veces. La zona subcapilar próxima a la membrana de Bruch contiene pequeños haces de fibras varicosas VIP(+), así como axones aislados que se dividen y terminan a ese nivel. Estas fibras aparecen en mayor número en la coroides posterior que en la anterior. En cambio, en la

coriocapilar no se observan fibras con inmunorreactividad positiva al VIP.

Asociado a los haces de fibras con inmunorreactividad VIP(+) también demostraron al igual que SHIMIZU (1982)¹¹² la presencia de cuerpos celulares neuronales VIP(+) aisladas o en pequeños grupos de hasta cuatro cuerpos. Cada ojo contenía aproximadamente 10 cuerpos neuronales, eran a menudo fusiformes con 30-50 μm . de longitud, con un núcleo no inmunorreactivo de 10 μm . y lipofuschina en su citoplasma. Estas células generalmente eran bipolares con una prolongación alargada a cada lado. También observaron alguna célula unipolar y multipolar. Se encuentran células tanto en coroides anterior como posterior. Por último, describieron que a lo largo de toda la úvea, la población de fibras con inmunorreactividad VIP(+) presenta varicosidades de un tamaño homogéneo 0,75 x 1,5 μm . a 1 x 2 μm . , una forma homogénea redonda u oval y una distancia intervaricosidad regular 2-5 μm .. Los segmentos intervaricosidades eran delgados y lisos ocasionalmente, y en una corta longitud una fibra inmunorreactiva puede tener grandes varicosidades, y alguna terminación nerviosa libre en ocasiones también.

UUSITALO y col. (1984)¹⁴² realizaron un nuevo estudio con anticuerpos frente al VIP, de la innervación coroidea en cobayas y humanos. Estos autores observaron en su trabajo que la densidad de fibras inmunorreactivas al VIP es mayor en la coroides del cobaya que en la humana, siendo la distribución de fibras muy similar en las dos especies. Las fibras forman un plexo que rodea a los vasos sanguíneos y en ocasiones también se situad aisladas en el estroma.

Esta distribución es similar a la observada por UDDMAN (1980)¹⁴⁰ y TERENCEHI (1982)¹³² en animales de experimentación y por MILLER (1983)⁸⁵ en humanos. Apoyándose en esta disposición de las fibras VIP inmunorreactivas rodeando a los vasos sugieren un papel vasoregulator de este neuropéptido en el flujo sanguíneo coroideo.

Una vez demostrada la existencia de fibras nerviosas con inmunorreactividad positiva al VIP en los tejidos oculares del gato (UDDMAN, 1980¹⁴⁰), del cobaya (TERENGHI, 1982¹³²; UUSITALO, 1984¹⁴²), y del hombre (MILLER, 1983⁸⁵; UUSITALO, 1984¹⁴²); y asimismo, de los altos niveles VIP detectados por RIA en la coroides del conejo (UNGER, 1981¹⁴¹); BUTLER y col. (1984)¹⁷ realizan denervaciones del facial y simpatectomías, para estudiar la inervación ocular y orbitaria del conejo con anticuerpos frente a este neuropéptido mediante la microscopía electrónica.

Estos autores demostraron que tras la denervación facial caían dramáticamente los niveles de VIP en el tejido ocular. Con la microscopía electrónica observaron una gran degeneración de los axones no mielinizados tanto de los nervios ciliares cortos como de las fibras nerviosas coroideas.

Estas fibras coroideas no mielinizadas degeneradas podrían tener un origen parasimpático, simpático o sensitivo, no pudiendo determinar su naturaleza al microscopio electrónico.

Por último, tras la simpatectomía no se encuentran cambios ni en los niveles oculares de VIP ni en las fibras VIP inmunorreactivas, postulando que las fibras oculares VIP inmunopositivas del conejo estarían formadas siempre por fibras no mielinizadas que tendrían su origen en el nervio facial.

Apoyando este trabajo, NILSSON y BILL (1984)⁹¹ en el mismo año, analizan los efectos del VIP en el ojo del conejo demostrando que es un potente vasodilatador coroideo. Esta vasodilatación se mantiene tras el bloqueo gangliónico, siendo los efectos del VIP mediados por un mecanismo postgangliónico, cuyo efecto no se reduce por el bloqueo muscarínico o gangliónico.

Estos hallazgos unidos a las observaciones previas de la vasodilatación coroidea producida por estímulo del facial (RUSKELL, 1970a,b,1971)¹⁰³⁻¹⁰⁵ les

induce a pensar que el VIP podría ser responsable de la vasodilatación coroidea no colinérgica producida por estímulo facial.

En 1985 UUSITALO y col.¹⁴³ realizan un nuevo estudio de la innervación uveal del cobaya, marcando las fibras nerviosas con Ac. frente al VIP. En él coinciden una vez más con las observaciones en trabajos previos, tanto en animales de experimentación como en humanos, describiendo una red de fibras finas y varicosas con inmunorreactividad VIP(+) que rodean a los vasos de pequeño y mediano tamaño. También observan fibras aisladas en el estroma pero la mayoría de las fibras VIP inmunopositivas se encuentran en relación con los vasos.

Apoyándose en esta distribución perivascular de las fibras nerviosas marcadas con Ac. frente al VIP, NILSSON y col. (1985)⁹² continúan con sus trabajos para estudiar la vasodilatación coroidea y su regulación, realizando un estudio en monos, gatos y conejos, tras estimulaciones del nervio facial.

En los monos ya se había demostrado la existencia de fibras eferentes del facial, que haciendo sinapsis en el ganglio esfenopalatino se distribuían en los vasos coroides (RUSKELL, 1971¹⁰⁵). Estos autores observan que tras la estimulación eléctrica del facial se produce un marcado incremento del flujo corioideo en las tres especies, siendo la vasodilatación coroidea resistente al bloqueo muscarínico también en todas las especies, lo que les permite excluir a la acetilcolina como único neurotransmisor periférico vasodilatador.

El neurotransmisor responsable de la vasodilatación, causada por estímulo del facial sería el VIP, pudiendo considerar la posible interacción del VIP y de la acetilcolina a nivel periférico, así como que ambos neurotransmisores podrían coexistir juntos en las fibras periféricas. Esto no se ha podido demostrar pero la distribución de las fibras VIP inmunorreactivas y de las fibras acetilcolinesterasas positivas tienen

el mismo patrón de distribución, como ya demostró TERENCE (1982)¹³² en el cobaya; lo que permite a estos autores postular que la acetil colina produciría vasoconstricción a través de un mecanismo directo y vasodilatación a través de un mecanismo indirecto endotelial, ambos efectos abolidos por bloqueo muscarínico. El efecto vasoconstrictor de la acetil colina podría reducir los efectos vasodilatadores del VIP durante el estímulo del facial.

Así la vasodilatación persistiría tras el bloqueo muscarínico por varias razones: pérdida del efecto vasoconstrictor de la acetil-colina y mayor liberación de VIP como respuesta al bloqueo. De todas estas observaciones los autores deducen que ambos neurotransmisores VIP y Acetil-colina podrían regular el flujo coroideo a nivel periférico.

STONE (1986b)¹²³ realiza diversos trabajos con métodos inmunohistoquímicos para estudiar la innervación uveal. Con Ac. frente al VIP demuestra una prominente innervación coroidea, en el cobaya, rata albina, gato y mono, con una distribución similar en las cuatro especies. Coincide en sus observaciones con los autores que habían utilizado previamente este anticuerpo demostrando fibras alrededor de los vasos coroides y fibras aisladas, incluso a nivel de la coriocapilar, donde sólo habían sido demostradas en humanos (MILLER, 1983)⁸⁵.

En las tres especies pigmentadas, por él estudiadas, observa ocasionalmente una asociación entre las fibras VIP inmunopositivas y los melanocitos, en aquellas zonas con alta densidad de fibras inmunopositivas.

En otro trabajo (STONE, 1986c)¹²⁴ describe en humanos una intensa y extensa innervación coroidea por fibras VIP inmunopositivas, que se situad rodeando a los grandes vasos, ocasionalmente en la capa de medianos y pequeños vasos, no pudiendo demostrarlas sin embargo, a nivel de la coriocapilar ni atravesando la membrana de

Bruch, en contra de las observaciones de MILLER (1983)⁸⁵. Asimismo también observa en humanos la fuerte asociación entre las fibras VIP(+) y los melanocitos, como ocurría en animales de experimentación.

Por último FLÜGEL y col. (1994a,b)^{40,41}, realizan un estudio de la innervación coroidea con anti-VIP, comparando sus resultados con los que obtiene al utilizar anticuerpos frente a la óxido nítrico-sintetasa (NOS) y la sinaptosina. La NOS es una enzima que se encuentra en las neuronas que contienen VIP, tanto en el S.N.C. como en el S.N.P. (KUMMER, 1992)⁶⁰. La sinaptosina es una glicoproteína de membrana específica de las membranas de las vesículas sinápticas (WIEDENMANN, 1985)¹⁵⁰.

Estos autores, demuestran en este trabajo que la coroides humana presenta células ganglionares NOS(+)-VIP(+)-sinaptosina(+), confirmando la observación inicial de MILLER (1983)⁸⁵ únicamente con VIP. Asimismo, estos autores también demuestran células ganglionares coroides NOS(+) y VIP(+) en zonas de coroides de monos cercanas a la fóvea.

Con anti-NOS se tiñe intensamente el citoplasma de la célula ganglionar, mientras que con anti-sinaptosina no se tiñe el citoplasma pero se observa bien los axones y terminaciones varicosas asociadas con el pericarion; también con los anticuerpos frente al VIP aparecen las células ganglionares envueltas en una red de axones varicosos VIP(+) tiñéndose también el citoplasma.

La importancia de este trabajo se basa en la presencia en la coroides de monos y humana de un gran número de células de células ganglionares, que al marcarse con anti-NOS están utilizando óxido nítrico como neurotransmisor. El óxido nítrico está implicado en la vasodilatación a través de la relajación del músculo liso vascular. Apoyándose en estos datos, los autores sugieren que esta densa innervación coroides podría estar implicada en el incremento del flujo coroides bajo determinadas

condiciones adversas, de gran luminosidad o de reducción de la presión arterial, mecanismos que son especialmente importantes en el área de la fovea.

*** El Neuropéptido-Y (NP-Y) como marcador de las fibras nerviosas coroideas.**

El NP-Y es un péptido compuesto de 36 aa. que fue aislado del cerebro de cerdo por TATEMOTO y col (1982)¹³⁰; siendo identificado posteriormente en las neuronas noradrenérgicas de los ganglios simpáticos por LUNDBERG (1982,1983,1985^{75,76,77} este autor, tras la realización de dobles inmuno utilizando anti-NP-Y y dopamina- β -hidroxilasa (DBH) (enzima de las neuronas noradrenérgicas), estos autores comprobaron que ambas sustancias coexisten en las neuronas simpáticas. Asimismo demostraron la existencia de NP-Y en las fibras nerviosas perivasculares del sistema autónomo de múltiples órganos, como el corazón y el intestino.

Basándose en la localización del NP-Y en las neuronas simpáticas del S.N.P., varios autores han utilizado anticuerpos frente a este neuropéptido para estudiar las fibras nerviosas coroideas.

Así, en un principio, TERENCEHI y col. (1982)¹³² realizan un amplio estudio de la inervación uveal del cobaya empleando anticuerpos frente a la DBH, demostrando la existencia de fibras DBH(+) que rodean a los vasos coroideos, junto a la presencia de células ganglionares(+) aisladas sin distribución preferencial.

Estos mismos autores (TERENGHI, 1983)¹³³, completan sus trabajos sobre

inervación uveal, realizando un estudio en el cobaya y la rata utilizando Ac. frente al NP-Y y DBH.

En su trabajo estos autores demuestran que en la coroides aparecen fibras con inmunorreactividad NP-Y(+), que se sitúan envolviendo a la circulación coroidea formando una red laxa alrededor de los vasos sanguíneos de forma continua. Estas fibras se encuentran a lo largo de toda la coroides y su patrón de distribución es similar al de las fibras que se marcan con Ac. frente a la DBH. Asimismo este patrón también coincide con el de las fibras VIP(+) descritas en sus trabajos previos.

Tras la simpatectomía extirpando el ganglio cervical superior no se produjo una disminución marcada de las fibras NP-Y(+) en la coroides. Esto sugiere según los autores que no todas las fibras se originarían en el ganglio cervical superior originándose alguna de ellas en neuronas locales.

BRÜUN y col. (1984)¹³ realizaron un estudio de la innervación uveal del cobaya con anticuerpos frente al NP-Y completando el estudio con la técnica de fluorescencia de FALCK y HILLARP (1962a,b,1965)³⁷⁻³⁹ para el marcaje de las fibras adrenérgicas.

Estos autores observaron que la distribución de las fibras NP-Y inmunopositivas y la de las fibras noradrenérgicas es similar, asimismo era coincidente con la observada tanto con inmunohistoquímica como con fluorescencia por otros autores en trabajos previos (TERENGHI, 1983¹³³).

Las fibras NP-Y(+) presentan unas granulaciones ovaladas características con pequeños intervalos regulares, al igual que las fibras VIP(+) descritas por Miller en humanos.

En la coroides las grandes arterias son innervadas por un denso plexo de fibras NP-Y(+) bien desarrollado localizado en la frontera entre la media y la adventicia, coincidiendo con la posición de las fibras adrenérgicas vasculares.

También observaron fibras con inmunorreactividad NP-Y(+) muy abundantes en el estroma corioideo entre los vasos sin aparente conexión con cualquier estructura identificable.

Completaron el estudio marcando, con Ac. frente al NP-Y, el ganglio cervical superior, donde encontraron numerosas neuronas con inmunorreactividad NP-Y positiva y fibras NP-Y(+). Posteriormente extirparon el ganglio cervical superior observando, que en la coroides disminuía el número de fibras NP-Y positivas pero eran todavía significativamente numerosas en todas las localizaciones corioideas observadas previamente.

Estas observaciones coincidían con las de TERENCEHI (1983)¹³³, apoyando la teoría de que no todas las fibras NP-Y positivas procederían del ganglio cervical superior.

Asimismo dado que la denervación simpática produce la desaparición de todas las fibras adrenérgicas marcadas por fluorescencia suponen que todas estas fibras derivarían del ganglio cervical superior.

También demostraron fibras adrenérgicas en localizaciones donde no aparecían fibras NP-Y(+)

Por tanto en la coroides había según estos autores:

- 1) fibras NP-Y(+) que derivarán del ganglio cervical superior que coexisten con fibras noradrenérgicas.
- 2) fibras NP-Y(+) que no derivan del ganglio cervical superior y no coexisten con fibras noradrenérgicas.
- 3) fibras noradrenérgicas que derivan del ganglio cervical superior y no coexisten con fibras NP-Y(+).

Estas observaciones les permiten suponer que el NP-Y podría realizar sus funciones, en ocasiones mediadas a través del Sistema Simpático, y en otras, de forma independiente a través de receptores agonistas locales.

SUNDLER y col. (1986)¹²⁹ realizan un estudio con anticuerpos frente al NP-Y en varios tejidos del S.N.P., incluyendo la uvea. En la coroides del cobaya demuestran la existencia de numerosas fibras NP-Y inmunorreactivas alrededor de las arterias coroides; pero la importancia real de su trabajo estriba en el estudio de las posibles funciones del NP-Y. Estos autores observaron que en todos los tejidos estudiados hay numerosas fibras NP-Y(+) alrededor de los vasos sanguíneos sobre todo en arterias, siendo menor su número en las venas. Asimismo realizan múltiples denervaciones, tanto quirúrgicas como químicas, específicas del Sistema Simpático, demostrando la naturaleza simpática de las fibras NP-Y. También demuestran que las enzimas precursoras de la síntesis de noradrenalina coexisten con el NP-Y en las neuronas de los ganglios simpáticos y en las fibras nerviosas originadas de ellos.

Todas estas observaciones les lleva a pensar, apoyando las ideas de BRÜUN y col. (1984)¹³, que en estas fibras simpáticas postganglionares coexistirán la noradrenalina y el NP-Y; siendo el NP-Y un cotransmisor y potenciador de la respuesta contráctil del músculo liso vascular ante la noradrenalina. El NP-Y realizaría tres funciones: vasoconstrictor directo débil, supresor prefuncional de la liberación de noradrenalina en las fibras adrenérgicas, y modulador postfuncional de la respuesta a la noradrenalina haciendo su vasoconstricción más duradera.

Estas teorías estarían en consonancia con los trabajos de NILSSON (1985)⁹² que sugieren la coexistencia del VIP, y la acetil-colina en las terminaciones colinérgicas, y su posible papel neuromodulador de ambos en la vasodilatación a nivel periférico.

STONE (1986a)¹²² realiza un estudio con anticuerpos frente al NP-Y en humanos, demostrando, como ya habían hecho otros autores en animales de experimentación, que la coroides humana contiene un moderado número de fibras

nerviosas con inmunorreactividad positiva al NP-Y, asociadas fundamentalmente a los vasos coroideos en todas las capas, siendo mayor su número en la de los grandes vasos. También observa, como con los anticuerpos frente al VIP, la fuerte asociación de las fibras NP-Y (+) a los melanocitos en la coroides humana.

Por último, completando el trabajo con denervaciones simpáticas, observa la desaparición de todas las fibras NP-Y, persistiendo las fibras noradrenérgicas, lo que apoya las teorías de BRÜUN (1984)¹³ y SUNDLER (1986)¹²⁹ sobre la coexistencia del NP-Y y la noradrenalina en las fibras periféricas coroideas.

*** La sustancia P (SP) como marcador de las fibras nerviosas coroideas.**

La SP es un neuropéptido descubierto por EULER y GADDUM (1931)³⁶. Tras ser aislada en la glándula pituitaria y ser sintetizada en el laboratorio fue localizada en el ganglio trigémino así como en otras estructuras del S.N.P. (BILL, 1979)⁹.

La existencia de esta sustancia en el globo ocular es determinada por DUNER (1954)²⁴, mediante la técnica del RIA; posteriormente BUTLER (1980,1981)^{15,16} y UNGER (1981)¹⁴¹, quienes estudian sus niveles en ojos de conejos normales y en los de animales previamente denervados tras extirpación del ganglio de Gasser. En los ojos normales encontraron niveles bajos, que disminuían dramáticamente tras la denervación; postulando que la SP tendría relación con las fibras sensoriales dependientes del V par.

Posteriormente, SHIMIZU (1982)¹¹², utiliza anti-SP para estudiar las terminaciones nerviosas uveales de varias especies de mamíferos (rata, ardilla, gato),

demostrando en la coroides de todas ellas, la presencia de fibras SP(+), que se situad alrededor de los vasos, sugiriendo el autor su posible papel regulador del flujo corioideo.

Sin embargo, TERENCEHI y col. (1982)¹³², en su estudio en el cobaya no encuentran fibras en la coroides SP(+), estando las últimas fibras SP(+) en el límite entre el iris y el cuerpo ciliar.

TERVO y col. (1982)¹³⁶ demuestran, en el conejo, la presencia de fibras nerviosas con inmunorreactividad sustancia P(+) rodeando a los vasos corioideos. Este hallazgo coincide con las determinaciones de sustancia P realizadas en la coroides de conejo por UNGER (1981)¹⁴¹, y con las observaciones de SHIMIZU (1982)¹¹² en otras especies animales.

Además, tras la denervación simpática por extirpación del ganglio cervical superior estas fibras permanecían en la coroides, sin embargo, tras la denervación sensitiva por extirpación del ganglio de Gasser todas las fibras SP(+) desaparecían. Esta desaparición de fibras SP(+) coincide con la caída de niveles de sustancia P por RIA en coroides tras la denervación sensitiva, ya demostrada por UNGER y col. (1981)¹⁴¹ y apoya la hipótesis de que las fibras SP(+) serían fibras sensitivas dependientes del ganglio de Gasser.

Finalmente, STONE y KUWAYAMA (1985)¹²¹ estudian la inervación del ojo humano utilizando anticuerpos frente a la SP.

Estos autores demuestran en sus trabajos que la SP se distribuye en los ojos humanos de forma muy parecida a los mamíferos. En contra de lo descrito por TERENCEHI (1982)¹³², observan fibras nerviosas con inmunorreactividad SP(+) en la coroides. Estas fibras eran poco numerosas, se localizaban alrededor de los

grandes vasos y ocasionalmente en zonas más profundas. Asimismo analizando secciones de tejidos de diferentes sectores coroideos, no encuentran diferencias ni de densidad ni de patrón de distribución.

Finalmente en una ocasión observan la asociación de una fibra SP inmunorreactiva a un melanocito coroideo. La yuxtaposición anatómica de la fibra les inducía a pensar en una posible relación funcional. Esta hipótesis presenta una cierta analogía con la postulada por LATIES (1974)⁶⁵ quien observó la influencia del Sistema Simpático en la síntesis melánica de los melanocitos uveales.

*** Otros péptidos marcadores de las fibras nerviosas coroideas.**

Además del VIP, del NP-Y y la SP, otros péptidos han sido utilizados por diversos autores para demostrar la innervación coroidea. De este modo, STONE y LATIES (1983)¹¹⁹ basándose en que los Ac. frente al polipéptido pancreático marcaban neuronas adrenérgicas del ganglio cervical superior, utilizan anticuerpos frente a este péptido para estudiar la innervación uveal adrenérgica del cobaya. Estos autores encuentran que la densidad de innervación marcada con los Ac. frente al polipéptido pancreático es moderada.

Las fibras nerviosas inmunopositivas rodean a los vasos coroideos, sobre todo a los grandes vasos, aunque se puede llegar a ver fibras que alcanzan la coriocapilar en contra de lo observado por otros autores con Ac. similares, como los del NP-Y. Dada la distribución similar de las fibras con inmunorreactividad positiva a estos Acs. frente al NP-Y y PP, y la de las fibras adrenérgicas; estos autores sugieren que ambos péptidos podrían coexistir en las mismas fibras adrenérgicas.

También STONE y col. (1984)¹²⁰, utilizan un anticuerpo frente a un péptido de la familia de la colecistoquinina gastrina, el optapéptido de la colecistoquinina o CCK-8, para estudiar la inervación ocular del cobaya.

Este péptido ya había sido identificado, tanto en el S.N.C., como en el Periférico, por LUNDBERG (1978,1979a^{72,73} y SCHULTZBERG (1980)¹⁰⁹; pero son estos autores los primeros en utilizar anticuerpos frente a este péptido en tejidos oculares; observando un modesto número de fibras inmunorreactivas que se encuentran en su mayor parte en la coroides. Estas fibras presentan las varicosidades características, son muy aisladas y siguen un curso similar al descrito con otros péptidos siendo su densidad mucho menor que la observada con otros péptidos. Esto podría ser debido, según estos autores, a que las fibras nerviosas tuviesen este antígeno peptídico en menor concentración que los otros, no siendo sensible a la inmuno.

Por último, estos autores detectaron células ganglionares CCK-8 positivas en el ganglio trigémino lo que apoyaría el origen sensorial de las fibras CCK-8 innnpositivas demostradas en el tejido ocular.

TERENGHI y col. (1985,1986)^{134,135} utilizan un nuevo anticuerpo para el estudio de la inervación ocular de varios mamíferos, el anticuerpo frente al péptido codificado por el gen de la calcitonina (CGRP). Este péptido había sido identificado en el Sistema Nervioso Central y en las neuronas sensoriales de las raíces dorsales medulares y del ganglio trigémino. Basándose en este hallazgo del péptido en el ganglio trigémino intentan demostrarlo en las fibras nerviosas oculares de la rata, cobaya, gato y mono.

Estos autores observan fibras CGRP inmunorreactivas en la uvea anterior y posterior de todas las especies estudiadas, siendo más numerosas en la uvea anterior. En la coroides encuentran un escaso número de fibras en el área central a menudo

asociadas a los vasos sanguíneos coroideos. En el ganglio trigémino demuestran numerosas células ganglionares con inmunorreactividad positiva al CGRP, grandes y pequeñas. También observaron fibras CGRP inmunorreactivas que en ocasiones se originaban de las neuronas CGRP(+). Utilizando una doble inmuno con anticuerpos frente al CGRP y la sustancia P; todas las células SP inmunopositivas presentaban también inmunopositividad al CGRP; mientras que, solamente una proporción de células CGRP tenían inmunorreactividad al SP. Las fibras nerviosas que partían de cuerpos neuronales que tenían co-localización del CGRP y de la sustancia P también tenían inmunorreactividad positiva para ambos péptidos.

Completaron su trabajo con denervaciones extirpando el ganglio trigémino y el cervical superior, y con el tratamiento con capsaicina, denervador selectivo de las neuronas sensitivas. Tras la extirpación del ganglio trigémino las fibras CGRP inmunopositivas desaparecían casi completamente; mientras que, tras la extirpación del ganglio cervical superior no hubo cambios ni en el número ni en la intensidad de tinción de dichas fibras. Asimismo tras el tratamiento con capsaicina, se produjo una gran deplección de las fibras. Todas estas observaciones les llevan a pensar en la posible naturaleza sensorial de las fibras CGRP(+).

Asimismo, STONE y col. 1988a¹²⁵, realizan un estudio de la innervación ocular en monos y humanos, con anticuerpos frente al CGRP. Como en las observaciones de trabajos previos empleando este mismo Ac. en animales de experimentación (TERENGHI, 1985¹³⁴), observan un moderado número de fibras nerviosas inmunorreactivas asociadas a los vasos sanguíneos en toda la uvea; sin embargo, son más numerosas en la coroides que en la uvea anterior, contrariamente a lo observado por TERENGHI¹³⁴.

Raramente observaron fibras individuales en las capas profundas y nunca las vieron en la coriocapilar. Esta distribución de fibras fue similar en el hombre y el

mono, siendo también similar a la distribución de las fibras SP inmunopositivas en estas dos especies estudiadas.

Sin embargo, no pudieron demostrar con técnicas de doble inmuno la colocalización de la inmunorreactividad positiva en la misma fibra al SP y al CGRP, ya demostrada en la rata y el cobaya.

Por último, al igual que con otros anticuerpos utilizados en sus trabajos, frente a la SP (STONE, 1985)¹²¹, al VIP (STONE, 1986b,c^{123,124}) y al NP-Y (STONE, 1986a)¹²², encuentran en ocasiones fibras nerviosas con inmunorreactividad CGRP(+) en yuxtaposición a los melanocitos coroideos, sugiriendo una vez mas cierta relación funcional de las fibras nerviosas con la síntesis de melanina.

También utilizando Ac. frente al CGRP, UUSITALO y col. (1989)¹⁴⁴ estudian la inervación uveal en el humano y el cobaya encontrando la coroides libre de fibras CGRP inmunopositivas en ambas especies; lo que contradice las observaciones previas de STONE (1988a)¹²⁵ y TERENCEHI (1985)¹³⁴. Sin embargo, en el ganglio trigémino demuestran una fuerte inmunorreactividad CGRP(+) en las células ganglionares de pequeño tamaño y en numerosas fibras delgadas y varicosas.

STROMBERG y col. (1987)¹²⁷ introducen un nuevo Ac. para el estudio de la inervación ocular, el Ac. frente a la galanina. La galanina es un neuropéptido aislado por primera vez en el intestino del cerdo, que posteriormente se identifica en el S.N.C. y en el S.N.P. Estos autores utilizan el Ac. frente a la galanina para estudiar la inervación de fibras galanina(+), tanto en el iris como en la coroides; siendo, en esta capa mucho más numerosas que en la uvea anterior. Las fibras formaban una red irregular en la coroides, constituyendo haces de fibras ocasionalmente. Estas fibras entrarían al iris desde la coroides en forma de gruesos haces.

Completando el trabajo con denervaciones, observan que tras la extirpación del ganglio cervical superior y del ganglio ciliar, se produce un marcado incremento del número de fibras galanina inmunopositivas; mientras que, la extirpación del trigémino produce la desaparición de las mismas. Asimismo marcaron células neuronales galanina(+) en el ganglio trigémino y en el cervical superior. En este ganglio, la galanina se encontraba en diferentes neuronas que el NP-Y, mientras que, en el trigémino algunas neuronas galanin inmunopositivas tenían también inmunorreactividad al CGRP; pero la mayoría no. Sugiriendo todas estas observaciones el posible origen sensorial de las fibras galanin inmunorreactivas.

STONE y col. (1988b)¹²⁶ utilizan de nuevo el Ac. frente a la galanina para el estudio de la inervación uveal del cerdo, En contra de las observaciones previas con este Ac. (STROMBERG, 1987¹²⁷) en la rata, observan que las fibras galanin inmunorreactivas se encuentran en la coroides en mucha menor proporción que en la uvea anterior, situándose sobre todo alrededor de los grandes vasos.

Estas fibras tienen una distribución similar a la de las fibras SP inmunopositivas, y con la técnica de la doble inmuno, observan la coexistencia de la inmunorreactividad a la galanina y a la sustancia P en la misma fibra.

GRIMES (1994)⁵¹, contrariamente a las descripciones de escasas fibras galanina(+) en la rata (STROMBERG, 1987¹²⁷) y el cerdo (STONE, 1988b¹²⁶); encuentra un denso plexo de fibras galanina(+) rodeando tanto a las arterias ciliares como a sus ramas, en la coroides del gato. Asimismo, también describe fibras aisladas galanina(+) en el estroma.

Al igual, que STROMBERG (1987)¹²⁷, demuestra células ganglionares galanina(+) en el ganglio cervical superior, coexistiendo con TH y NP-Y. También demuestra células galanina(+) en el ganglio pterigopalatino coexistiendo con VIP,

y por último también las demuestra en el ganglio ciliar.

Completando sus trabajos con denervaciones, observa que tras extirpar el ganglio cervical superior, no disminuyen las fibras galanina(+) que rodean a los vasos coroideos, pudiendo por tanto, provenir estas fibras (que serían probablemente parasimpáticas) del ganglio pterigopalatino, encargándose de regular junto con el VIP la vasodilatación coroidea.

Finalmente BILL (1991)¹⁰ realiza un trabajo para analizar los efectos de los distintos neuropéptidos en la uvea de varias especies, afirmando que la liberación de estos péptidos, que se encuentran tanto en los nervios autonómicos como en los somatosensoriales, podría explicar efectos inducidos en el ojo que no pueden ser debidos a los neurotransmisores clásicos (BILL, 1962⁸).

Este autor, apoyándose en los trabajos previos sobre neuropéptidos en los que se estudiaron las fibras nerviosas, tanto de la uvea anterior como posterior, describe la localización de los diferentes neuropéptidos. Así las fibras trigeminales del ojo contienen substancia P (SP), péptido codificado por el gen de la calcitonina (CGRP), y colacistoquinina (CCK). Las fibras parasimpáticas procedentes del nervio facial contendrían péptido vasoactivo intestinal y por último las fibras simpáticas contienen neuropéptido Y.

Realizando distintos estímulos a nivel central demuestran que tras la estimulación del ganglio trigémino en los conejos se produce liberación de SP, CGRP y CCK. También se produce tras el estímulo ganglionar hiperemia, miosis, rotura de la barrera hematoacuosa y aumento de la presión ocular en esta especie. Estas acciones parecen debidas a la SP y a la CGRP. Asimismo, tras la estimulación del nervio facial se produce vasodilatación en la uvea del conejo, esta vasodilatación no es abolida por bloqueantes muscarínicos y podría ser debida a la liberación del VIP en las fibras nerviosas uveales.

Por último, el NP-Y produce vasoconstricción uveal en el conejo. La liberación de este péptido explicaría la vasoconstricción no adrenérgica que se produce por estímulo simpático a altas frecuencias.

B.- *Estudios mediante técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos frente a filamentos intermedios.*

De forma paralela a los trabajos realizados sobre la innervación uveal con anticuerpos frente a neuropéptidos, otros autores utilizan diferentes anticuerpos para tratar de esclarecer la distribución morfológica de las fibras nerviosas coroideas. Estos anticuerpos son los marcadores de los filamentos intermedios propios de las células nerviosas.

Todas las células eucariotas se caracterizan por la presencia en su citoplasma de una serie de estructuras filamentosas que constituyen el citoesqueleto. Estas estructuras son de distinta naturaleza y están constituidas por microtúbulos (22-25 nm), microfilamentos (5-7 nm), y por unos filamentos de 7-11 nm que debido a su tamaño fueron denominados filamentos intermedios (FRANKE y col. 1978⁴²; LAZARIDES, 1980⁶⁶; NAGLE, 1988⁸⁸).

En la actualidad gracias a los nuevos estudios en los que se incorporan la secuenciación de genes, los mapeos peptídicos, los análisis de la secuencia de aminoácidos, y la reactividad antigénica; estos filamentos intermedios se han clasificado en cinco grupos basándose en sus homologías químicas y estructurales (STEINER y col. 1985, 1988, 1990¹¹³⁻¹¹⁵; NAGLE, 1988⁸⁸). Dentro del tipo tres se

encuentra la proteína gliofibrilar ácida (PGFA) de 51kd presente fundamentalmente en los astrocitos. Así mismo dentro del tipo cuatro, se encuentran la tres proteínas que forman parte de los neurofilamentos como NF-L (60-70 kd), NF-M (160 kd), NF-H (200 kd), presentes fundamentalmente en las neuronas.

De este modo, un pequeño grupo de autores utiliza anticuerpos frente a estos filamentos intermedios propios de los astrocitos y de las neuronas para estudiar la innervación coroidea.

*** Estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos frente a la PGFA.**

Características generales de la PGFA.

La proteína gliofibrilar ácida constituye la subunidad de los filamentos intermedios gliales. Un rasgo característico de las células astrogiales es la capacidad para formar fibras bajo condiciones patológicas (gliosis reactiva). Aprovechando esta propiedad, se aisló a partir de tejido con gliosis fibrosa, una proteína ácida de 42 Kd que era el componente fundamental de este tejido; siendo esta proteína el constituyente principal de los filamentos intermedios de los astrocitos. UYEDA, ENG, y BIGNAMI (1972)¹⁴⁵, produjeron en conejo anticuerpos específicos contra esta proteína, observando que el anticuerpo anti-PGFA reaccionaba con extractos de cerebro humano tanto normal como patológico. Posteriormente, al perfeccionarse los métodos de aislamiento de los filamentos en cerebro, se pudieron separar proteínas de 50 kd (DAVISON y WILSON, 1974²³) que finalmente fueron identificadas como las subunidades constituyentes de los filamentos gliales (LIEN, 1978, 1981^{67,68}).

El anticuerpo frente a la PGFA es un buen marcador de las células

astrogliales al teñir selectivamente los astrocitos de las distintas especies de mamíferos (BIGNAMI, 1972⁷; GHANDOUR, 1979⁴⁸). Sin embargo otros estudios han encontrado inmunorreactividad PGFA(+) fuera del sistema nervioso central; como en los nervios periféricos (BIGNAMI, 1972⁷; YEN, 1981¹⁵³; DALH, 1982²¹), en el sistema nervioso entérico (JENSEN, 1980, 1984^{55,56}; BJÖRKLUND, 1984a¹¹); en el iris (BJÖRKLUND, 1984b¹²; TRIVIÑO, 1989¹³⁸), y finalmente en las células satélites del ganglio simpático (ALVAREZ, 1989¹).

En general, la inmunorreactividad PGFA(+) en el sistema nervioso periférico se encuentra restringida a las células de Schwann no formadoras de mielina, que presentan un citoesqueleto con filamentos de 10 nm. semejantes a los de las células astrogliales del sistema nervioso central (JENSEN, 1984⁵⁶; DAHL, 1982²¹). MOKUNO y col. (1989)⁸⁶ trataron de explicar porqué el anticuerpo anti-PGFA marcaba las células de Schwann. Estos autores observaron que el ARNm de las células de Schwann del nervio ciático de la rata era similar tanto en secuencia como en tamaño al ARNm de la PGFA del sistema nervioso central. Esta similitud entre ambos sugirió a estos autores, que la posibilidad de que estos péptidos estuviesen transcritos por el mismo gen; y que las diferencias inmunogénicas existentes entre ambas PGFAs serían el resultado de un patrón alternativo de fosforilación o de procesos translacionales de estos péptidos.

Estudios mediante anticuerpos marcadores de la PGFA

Apoyándose en la identificación de la proteína gliofibrilar ácida en las células de Schwann de múltiples nervios del S.N.P. (JENSEN, 1984⁵⁶; DAHL, 1985²²; RÁMIREZ, 1989, 1990^{97,98}; TRIVIÑO, 1989¹³⁸) estudian la inervación uveal en el conejo utilizando anticuerpos frente a esta proteína. Estos autores marcan las células

de Schwann de las fibras nerviosas coroideas demostrando inmunorreactividad PGFA(+) en toda la extensión coroidea (superior, inferior, temporal y nasal). Esta inmunorreactividad se encontraba en la capa de los grandes y medianos vasos, estando ausente en la coriocapilar. La señal PGFA(+) se localizaba según estos autores, sobre todo, en relación con las paredes vasculares debido a la presencia de múltiples fibras perivasculares que se encontraban tanto en arteriolas como en vénulas; además de estas fibras perivasculares describen en sus trabajos otras fibras que se situad entre los vasos haciendo contacto en ocasiones con la pared de los mismos.

*** Estudios mediante técnicas inmunohistoquímicas con Ac. frente a neurofilamentos.**

Características generales de los neurofilamentos.

El citoesqueleto de las neuronas de los vertebrados y de algunos invertebrados, está constituido por microtúbulos y neurofilamentos (NF) (filamentos intermedios del tipo IV) (WUERKER, 1972¹⁵²).

Estructuralmente los NF son muy similares a los filamentos intermedios de 10 nm. presentes en otros tipos celulares. Son unos componentes muy abundantes en los axones, donde se disponen paralelos al eje de los mismos (WUERKER, 1972¹⁵²). En muchas ocasiones los NF están interconectados entre sí, y también pueden unirse a microtúbulos mediante una especie de puentes transversales visibles al microscopio electrónico (HIROKAWA, 1986⁵³). Los NF pueden estar dispersos por el axon o bien se pueden disponer en haces, normalmente se extienden sin interrupción durante

grandes distancias, pero se hacen discontinuos a nivel de los nodos de Ranvier (TSUKITA, 1981¹³⁹).

Cuando se analizó bioquímicamente el tejido neuronal, inicialmente se identificó a la proteína de 50 Kd como una subunidad de los NF (DAVIDSON, 1974²³). Estudios posteriores comprobaron que esta proteína era la subunidad polipéptídica de los filamentos gliales (LIEM, 1978⁶⁷) que estaba contaminando las preparaciones que se utilizaban para aislar los NF.

En los trabajos subsiguientes se demostró que los NF estaban constituidos por un complejo de tres proteínas, con un peso molecular de: 200 Kd (NF-H), 160 Kd (NF-M), y 68 Kd (NF-L)., al que se denominó triplete de NF (LIEM, 1978⁶⁷). Estos tres polipéptidos forman los filamentos intermedios del tipo IV en la relación molar: 1:2:6 (NF-H, NF-M, NF-L) (NIXON, 1986⁹³).

Gran cantidad de estudios sobre el triplete de los NF han sugerido que los polipéptidos son distintos pero están relacionados evolutivamente; tendrían determinantes antigénicos propios de cada tipo y otros comunes a los tres (WILLARD, 1981¹⁴⁶); pero cada una de estas proteínas derivaría de poblaciones diferentes de ARNm (GEISLER, 1983⁴⁶). Los NF de los reptiles, aves y mamíferos, están estrechamente relacionados (SHAW, 1984¹¹¹), aunque presentan pequeñas diferencias en su peso molecular entre proteínas homólogas. Además, algunas especies animales sólo poseen dos de los componentes del triplete, el tercero que generalmente es el NF-H, está ausente o reducido (TASSCOT, 1980¹³¹), lo que sugiere que el NF-H no es absolutamente necesario para la formación de NF (SCHLIWA, 1985¹⁰⁷).

Las proteínas de los NF parecen ser sintetizadas a nivel del pericarion celular, y a partir de ahí, son transportadas lentamente hacia la periferia y las prolongaciones axonales (NIXON, 1986⁹³).

Características estructurales de los NF.

Los NF, como el resto de los filamentos intermedios, tienen una región α -helicoidal central común de aproximadamente 40 Kd, compuesta por 310 aa. La parte restante del peso molecular de cada una de estas moléculas se debe por un lado al dominio amino-terminal y por otro a la gran extensión del dominio carboxilo-terminal. El dominio C-terminal de los NF es rico en aminoácidos cargados, particularmente en ácido glutámico. Tiene distinta secuencia de aa. en cada NF del triplete y aumenta de tamaño al incrementarse el peso molecular del NF.

Se cree que los tres polipéptidos de los filamentos se alinean por sus dominios centrales para constituir el esqueleto de los NF. Los dominios C-terminal cargados de los NF-H y NF-M protuyen desde el esqueleto y van a formar parte de las interconexiones fibrilares que se pueden dar entre los NF y entre estos y los microtúbulos (RUNGE, 1981¹⁰²; GEISLER, 1985⁴⁷; HIROKAWA, 1986)⁵³. De esta forma, la proteína de 68 Kd (NF-L) va a formar el esqueleto del filamento, mientras que la proteína de 200 Kd (NF-H) se encuentra localizada en la periferia de los NF a nivel de los puentes transversales, y por último la proteína de 160 Kd (NF-M) también forma parte del esqueleto pero menos uniformemente que la NF-L, apareciendo localizada en la base de los puentes transversales (HIROKAWA, 1986⁵³).

Los estudios sobre la repolimerización de los NF (LIEM, 1981⁶⁸) muestran que la subunidad 69 Kd, es capaz por sí misma, de formar NF con morfología

normal (FRANKE, 1982⁴³); mientras que los NF de 160 y 200 Kd, únicamente pueden polimerizarse si está presente la subunidad de 68 Kd.

Las funciones de los NF-H y NF-M podrían ser dos: por un lado pueden interactuar vía dominio α -hélice con el núcleo del NF constituyendo parte del esqueleto; y por otro, vía dominio C-terminal protuyendo desde la pared del filamento para actuar en otras asociaciones macromoleculares (RUNGE, 1981¹⁰²; BUNGE, 1986¹⁴).

Fosforilación de los NF.

Las proteínas de los NF se encuentran altamente fosforiladas. Los análisis de los NF de médula de rata han demostrado que los NF-L, NF-M y NF-H, contienen respectivamente, 3, 9, y 22 moles de fosfato por mol de péptido (JULIEN, 1985⁵⁷). Los niveles de fosforilación varían dependiendo de la localización de los NF; los NF-H experimentan una gran fosforilación post-translacional cuando la proteína es transportada desde el pericarion hasta el axon (NIXON, 1986⁹³).

Se han desarrollado Ac. monoclonales que distinguen epítomos de los NF fosforilados y no fosforilados. Cuando se aplicaron estos Ac. en secciones de cerebro de rata, se observó que los somas de las células nerviosas, sus dendritas, y las porciones proximales de los axones tenían filamentos no fosforilados, mientras que las fibras largas de axones, los tenían fosforilados (SCHILIWA, 1985¹⁰⁷). Esto podría indicar que según el nivel de fosforilación, los NF podrían regular su función. Asimismo, se ha demostrado que los NF no fosforilados están sólo en el cuerpo celular, mientras que los altamente fosforilados se encuentran únicamente en el axón; así los NF de fosforilación baja están presentes en el cuerpo celular y en las

prolongaciones próximas al pericarion (MATUS, 1988⁸²). El nivel de fosforilación del NF-H es paralelo durante la maduración axonal a la disminución del transporte axonal y al crecimiento del calibre axonal. Así los NF penetran en el axon desde el pericarion, su flujo se hace más lento a medida que se fosforilizan, porque se van acumulan y producen el crecimiento axonal.

Estudios de la inervación coroidea mediante Ac. marcadores de los NF.

Como con los trabajos realizados con Ac. frente a neuropéptidos se marcaban las sustancias peptídicas que se encontraban en la fibra nerviosa ocular, pero no su verdadero citoesqueleto, diversos autores utilizan Ac. frente a los NF para realizar una descripción morfológica de las fibras nerviosas uveales.

Así, SEIGER y col. (1983)¹¹⁰ fueron los primeros autores que utilizan Ac. frente a neurofilamentos para el estudio de la inervación ocular de la rata, gato y vaca. En la coroides de la rata adulta, describen en la proximidad del cuerpo ciliar, unos haces de axones gruesos no ramificados que son casi las únicas fibras que se pueden ver a ese nivel. Sin embargo, en las partes centrales coroides observan una intensa inervación por fibras con inmunorreactividad NF positiva que forman plexos alrededor de los vasos sanguíneos siguiéndolos en su recorrido. También demostraron haces de axones delgados y fibras individuales ramificadas con una apariencia discontinua.

Asimismo encontraron inmunorreactividad con estos Ac. en todas las neuronas del ganglio ciliar, en la mayoría de las neuronas del ganglio cervical superior y en el ganglio trigémino. No encontrando neuronas con inmunopositividad a los NF en la capa corioidea.

STEPHEN y PILAR (1987)¹¹⁶ estudian la innervación colinérgica de las células musculares de gallina, mediante técnicas inmunohistoquímicas con microscopía óptica y electrónica. Para realizar su trabajo utilizan un anticuerpo monoclonal frente a un elemento del citoesqueleto neuronal indefinido, que extraen de un hibridoma de ratón. Estos autores observan en la coroides una densa red de fibras nerviosas que corren entre las grandes arterias y venas sin innervarlas intensamente, encontrando la innervación más densa rodeando a los vasos de menor tamaño.

Posteriormente, realizaron una extirpación del ganglio ciliar para determinar la contribución de la innervación colinérgica en las fibras nerviosas observadas con este anticuerpo; comprobando que la intensidad de la inmuno disminuye dramáticamente quedando muy pocas fibras tras la denervación.

Con el empleo de microscopía electrónica demuestran que las ramificaciones de los nervios coroides están formadas por axones mielinizados que corren próximos al límite escleral de la coroides, y posteriormente se van a ramificar en nervios musculares. Asimismo observan una densa red de nervios colinérgicos que hacen sinápsis en pasada en el músculo liso de los vasos coroides. Estas ramas nerviosas musculares son axones no mielinizados y la mayoría de sus prolongaciones contienen densos acúmulos de vesículas claras y pequeñas. Los axones terminales corren en grupos y se sitúan generalmente junto a los procesos de la célula de Schwann, que al menos rodea en parte a cada fibra axonal. Existen en ellos, unos aparentes sitios de transmisión llenos de vesículas que ocasionalmente se visualizan próximas a las membranas musculares, no existiendo ni engrosamiento ni otra aparente especialización sináptica ni en el axón ni en la membrana muscular. Estas fibras nerviosas musculares y su sinápsis en pasada ya habían sido observadas en humanos (LYNETTE-FEENEY, 1961a,b)^{69,70} y en monos (RUSKELL, 1971¹⁰⁵; BERGMANSON, 1977⁴), previamente con la microscopía electrónica..

Asimismo, describen dos tipos diferentes de células musculares lisas en las arteriolas coroideas. Células musculares lisas que se situan inmediatamente adyacentes a la pared endotelial del vaso que no reciben innervación y actuarían por factores químicos; y células musculares lisas que se sitúan en la capa más externa de las arteriolas, que son mucho más indiferenciadas, son elongadas, y están altamente innervadas por las fibras musculares nerviosas.

Finalmente, EPSTEIN y col. (1988)³³ utilizan de nuevo anticuerpos frente a neurofilamentos para estudiar la innervación de la coroides de gallina, demostrando fibras nerviosas a lo largo de todo el espesor corioideo. Aunque la verdadera importancia de este trabajo, es la demostración de dos tipos neuronales en el ganglio ciliar de la gallina utilizando anticuerpos frente a la somatostatina, la SP y la acetil colintransferasa. Estos dos tipos neuronales se diferencian por su tamaño y sus terminaciones presinápticas, en neuronas coroideas y ciliares.

Las neuronas coroideas son pequeñas, están rodeadas de terminaciones presinápticas en botón con inmunorreactividad positiva a la SP y a la somatostatina.

Las neuronas ciliares son de menor tamaño, tienen terminaciones presinápticas en forma de cáliz y capuchón, presentando inmunopositividad a la acetilcolín transferasa en todas ellas.

Realizando inmuno dobles demuestran una co-localización de la inmunopositividad a los neurofilamentos y a la somatostatina en los mismos haces de fibras coroideas, incluso hasta en fibras individuales. También observaron co-localización de inmunorreactividad a la somatostatina y a la acetil colinesterasa en los mismos haces nerviosos.

Como las neuronas coroideas del ganglio ciliar presentan una escasa y ausente inmunorreactividad a la acetil colintransferasa, y en cambio, hay fibras nerviosas coroideas inmunorreactivas, sugieren que la acetil-colintransferasa se produciría en

la misma terminación nerviosa. En cambio, la somatostatina se localizaría tanto en las neuronas coroideas del ganglio ciliar como en las terminaciones presinápticas coroideas.

2.- JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

2.- JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.

La coroides es la capa vascular del globo ocular implicada en múltiples funciones, entre las que se encuentran principalmente: la alimentación de las capas externas de la retina, y la regulación de la temperatura ocular como un mecanismo de defensa retiniano ante cambios importantes de temperatura.

Desde las primeras descripciones morfológicas de la coroides, el estudio de su inervación ha sido tomado con gran interés por los distintos autores, apareciendo trabajos morfológicos y fisiológicos que demuestran el importante papel que juega esta capa dentro de la fisiología del globo ocular.

Si bien, los primeros trabajos morfológicos (aparecidos entre finales del siglo pasado y mediados del presente siglo) realizados mediante impregnaciones argénticas son relativamente abundantes, la disparidad de los hallazgos y las controversias suscitadas con ellos, hicieron que este tema no quedase ni mucho menos concluido.

La aparición de nuevos métodos histológicos, como las técnicas histoquímicas que se apoyan en la fluorescencia específica que desarrollan los nervios adrenérgicos y colinérgicos tras un tratamiento previo histoquímico, abrió un nuevo campo para el estudio de la morfología y distribución de las fibras nerviosas coroides, permitiendo estudiar su posible origen, adrenérgico o colinérgico, en el Sistema

Nervioso Autónomo (S.N.A.).

Sin embargo, son actualmente las modernas técnicas inmunohistoquímicas las que han permitido estudiar de forma más específica la naturaleza de las fibras nerviosas coroideas, utilizando diferentes marcadores celulares. Pero, a pesar de la abundancia de trabajos inmunohistoquímicos realizados en estos últimos años, son muy escasos los estudios propiamente morfológicos, ya que se han utilizado como marcadores sustancias o neuropéptidos transportados por las fibras nerviosas, pero no contra estructuras propias de ellos. Estos trabajos, han permitido, por tanto, realizar un estudio de la inervación fundamentalmente desde un punto de vista fisiológico o funcional, determinando la naturaleza simpática/parasimpática o sensorial de las fibras, estando inacabado el estudio morfológico de la distribución y localización de las mismas en el tejido corioideo.

Por tanto, debido a la escasez de estudios morfológicos de la inervación corioidea con técnicas inmunohistoquímicas, y dada la importancia funcional de este tejido ocular, hemos pretendido realizar un estudio inmunohistoquímico utilizando dos marcadores de las fibras nerviosas coroideas:

- por un lado, anti-PGFA, como marcador de las células de Schwann de los axones amielínicos corioideos;
- y por otro, anti NF-68, NF-160 y NF-200, como marcadores de los axones,

tanto mielínicos como amielínicos, coroideos.

Con estos marcadores hemos tratado de determinar la localización, distribución y morfología de las fibras nerviosas coroideas y su relación con las distintas estructuras de la coroides; ya que conociendo la inervación coroidea se pueden sentar las bases para el mejor conocimiento de la fisiología de la coroides y su posible implicación en patologías del globo ocular.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1.- CASUÍSTICA.

Hemos utilizado 25 conejos albinos adultos (*Oryctolagus cuniculus*) de raza New Zealand, cuyo peso estaba comprendido entre 3½-4 Kg., que procedían del Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Para completar este estudio se han utilizado los 50 ojos de estos animales, que fueron empleados para la realización de diferentes técnicas, distribuyéndose de la siguiente manera:

- 10, para las impregnaciones argénticas
- 40, para las técnicas de inmunocitoquímicas:
 - * 10, empleando anti-GFAP:
 - * 30, empleando anti-NF:
 - # 10, empleando anti NF-68
 - # 10, empleando anti NF-160
 - # 10, empleando anti NF-200

3.2.- DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS.

3.2.1.- IMPREGNACIONES ARGÉNTICAS.

3.2.1.1.- Obtención del tejido. Montajes planos de coroides.

Cuando los ojos van a ser estudiados con tinciones de plata hemos sacrificado a los animales mediante sobredosis de pentobarbital sódico, inyectado por vía intravenosa. Seguidamente procedemos a la enucleación de los dos globos oculares y a su fijación en formol tamponado al 10% durante un tiempo mínimo de tres días.

Una vez realizada la fijación, hay que separar la coroides del resto de las tunicas oculares. Para ello practicamos un corte alrededor del limbo esclerocorneal a 1-2 mm. de éste en el lado escleral, extirpando en bloque los elementos que quedan por delante de esta línea, es decir: cornea, iris, cristalino y cuerpo ciliar. De este modo queda sólo la parte posterior de la retina, unida a la coroides y esclera. Finalmente procedemos a separar estas tres capas: primero disecamos la retina, y seguidamente retiramos la coroides. Esta operación se realiza ayudándonos con un pincel de punta muy fina (000).

Para obtener una mayor comodidad en el manejo y montaje, así como facilitar la orientación de los lados nasal, temporal, superior e inferior, dividimos el tejido

coroideo obtenido en dos zonas, izquierda y derecha mediante un corte supero-inferior.

Una vez separada la coroides del resto de las tunicas oculares, utilizamos para su tinción:

- el método de Cajal para neurofibrillas (RAMÓN y CAJAL, 1933)⁹⁹
- la modificación de Liss a la impregnación argéntica de Del Río Hortega (LISS, 1956)⁷¹.

Tras teñir el tejido procedemos al montaje de la coroides extendiéndola horizontalmente sobre un portaobjetos; lo cual debe realizarse antes de realizar las deshidrataciones.

3.2.1.2.- Realización de las tinciones.

El protocolo seguido para la realización de cada uno de estos dos métodos de plata fue el siguiente:

A.- Método de Cajal para la tinción de las neurofibrillas. (RAMÓN y CAJAL, 1933)⁹⁹

Los pasos a seguir para su realización son:

- 1.- Se introducen las coroides en H₂O destilada con unas gotas de formol.
- 2.- Lavado de la preparación de forma rápida en varios baños de H₂O.
- 3.- Traslado de las coroides a una solución de Nitrato de Plata al 2%, al que se le añade piridina (20 gotas/50 ml. de solución), durante 15 min. a 60°C.
- 4.- Se pasan las coroides a un baño de alcohol 96°, al que se le añaden unas gotas de Nitrato de Plata al 2%.
- 5.- Introducción del tejido en una solución reductora de hidroquinona, durante 1 min.^a
- 6.- Lavado en H₂O destilada.
- 7.- Colocación de la coroides sobre un portaobjetos (montaje plano).
- 8.- Deshidratación del montaje plano en una serie creciente de alcoholes (60°, 80°, 90°, absoluto) e introducción final en xilol.
- 9.- Por último se procede a cubrir el montaje con bálsamo de Canadá (Merck) y un cubreobjetos.

Con esta tinción las fibras mielínicas y amielínicas se tiñen de color pardo.

^aLa solución reductora se prepara de la siguiente forma:

- hidroquinona: 0,30 grs.
- agua destilada: 70 cm³
- formol: 20 cm³
- acetona: 15 cm³

B.- *Modificación de Liss a la triple impregnación argéntica de Del Río Hortega.*

(LISS, 1956)⁷¹

Los pasos a seguir para su realización son:

- 1.- Fijar en formol o bromoformalina.
- 2.- Lavar 2-3 min. en H₂O destilada. a la que se le ha añadido previamente 20-30 gotas de NH₃ concentrado.
- 3.- Lavar 1-2 min. en H₂O destilada.
- 4.- Transferir las preparaciones a una solución de Nitrato de Plata al 2% con 20 gotas de piridina y 40 gotas de alcohol de 96°. Dejando las preparaciones a temperatura ambiente y protegidas de la luz durante 24-72 horas^b.
- 5.- Pasar el tejido a una solución débil de Carbonato de plata con 20 gotas de piridina y 40 gotas de alcohol de 96°; durante 2-4 días.^c

^bEl tiempo que las coroides deben permanecer en esta solución debe ir controlándose periódicamente, hasta que se observe que el tejido ha adquirido una tonalidad amarillo-pardo

^cLa forma de preparar la solución de carbonato de plata es:

- 100 ml. de nitrato de plata al 10% y carbonato sódico al 5%
- añadir NH₃ concentrado hasta disolver los precipitados (evitando el exceso de amoníaco)

Esta solución se conserva en la oscuridad durante 6-8 semanas. la dilución se debe realiza cuando se vaya a utilizar.

Esta solución se puede usar a tres concentraciones:

| | DÉBIL | MEDIA | FUERTE |
|----------------------------|---------|---------|---------|
| SOLUCIÓN | 100 ml. | 100 ml. | 100 ml. |
| H ₂ O DESTILADA | 275 ml. | 100 ml. | 25 ml. |

- 6.- Transferir las preparaciones, sin lavar, a Nitrato de Plata amoniacal con 40 gotas de alcohol de 96°, durante 30-60 seg.^d
- 7.- Reducir en formol al 1% al que se le añaden 10 gotas de piridina; durante 30 seg.
- 8.- Lavar en H₂O destilada durante 30 seg.
- 9.- Transferir a una solución de Cloruro de Oro al 2%, durante 20 min. a temperatura ambiente.
- 10- Lavar en H₂O destilada durante 30 seg.
- 11- Pasar a Tiosulfato al 5%, durante 5 min.
- 12- Lavar en H₂O destilada.
- 13- Realizar el montaje plano.
- 14- Deshidratar y montar con bálsamo de Canadá.

Con esta técnica las fibras nerviosas y las células ganglionares se tiñen de color negro.

^d *Preparación del Nitrato de Plata amoniacal:*

Se añade NH₃ a una solución de nitrato de plata al 2% hasta que el precipitado se disuelva (evitar el exceso de amoníaco)

3.2.2.- TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS.

Para la demostración de las fibras nerviosas coroideas utilizamos la detección inmunocitoquímica con diversos anticuerpos:

- Ac. contra la proteína gliofibrilar ácida (PGFA)
- Ac. contra el triplete de neurofilamentos (NF) de diferente peso molecular: anti NF-68, anti NF-160, y anti NF-200.

Estos anticuerpos fueron puestos de manifiesto mediante la técnica de la peroxidasa antiperoxidasa desarrollada por STERNBERGER (1970)¹¹⁷.

3.2.2.1.- Obtención del tejido.

La fijación la hemos realizado mediante la perfusión del fijador por vía endocarotídea, siendo importante mantener vivo al animal hasta el momento de ser perfundido el fijador, para lograr una mayor preservación del antígeno tisular.

Como fijador usamos en estos casos paraformaldehído al 4% en solución de tampón fosfato (pH 7,4; 0,1M).

Una vez canalizadas las dos carótidas y seccionadas las venas yugulares externas (RAMÍREZ, 1983)⁹⁶, procedemos al lavado del árbol vascular con tampón

fosfato salino (PBS) durante 2-3 min., siendo sustituido éste, al cabo de este tiempo por el paraformaldehído al 4%. Se mantiene la entrada de fijador durante 30 min, tiempo suficiente para introducir 500 ml. del fijador a través de las carótidas. Transcurrido este tiempo, enucleamos los globos oculares y los introducimos en recipientes con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (pH 7,4; 0,1M) para su postfijación durante 4-12 horas a 4°C.

Posteriormente separamos la coroides del resto de los tejidos oculares, procediendo para ello de la misma forma descrita anteriormente.

3.2.2.2.- Anticuerpos utilizados.

Los sueros empleados han sido:

- Anticuerpo monoclonal contra la proteína gliofibrilar ácida, desarrollado en ratón: anti-PGFA, clon GA-5 (Sigma, USA)
- Anticuerpo monoclonal contra los neurofilamentos de pm 68, desarrollado en ratón: anti NF-68, clon N124 (Biomakor, Israel).
- Anticuerpo monoclonal contra los neurofilamentos de pm 160, desarrollado en ratón: anti NF-160, clon NN18 (Biomakor, Israel).

- Anticuerpo monoclonal contra los neurofilamentos de pm 200, desarrollado en ratón: anti NF-200, clon NE14 (Biomakor, Israel).
- Anticuerpo contra las IgG de ratón, desarrollado en cabra: anti IgG-ratón (Sigma, USA)
- Complejo peroxidasa antiperoxidasa, desarrollado en ratón: PAP- ratón (Sigma, USA)

En todos los casos las diluciones de los sueros las hicimos en PBS conteniendo NGS (suero normal de cabra; Sigma) al 1% y Triton X-100 (Merck) al 0,2%; excepto la PAP que se diluye sólo en PBS.

Además, en todas las inmunotinciones realizadas se efectuó el correspondiente control, eliminado la incubación con el anticuerpo primario (anti-PGFA ó anti-NFs), que fue sustituido por suero normal del animal huésped (en este caso NGS) .

3.2.2.3.- Realización de las inmunotinciones.

Las inmunotinciones se han realizado sobre montajes planos de coroides, y los protocolos han sido:

A.- Técnica de la PAP en montajes planos con anti-PGFA.

- 1.- Lavado en PBS.
- 2.- Paso por alcohol de 80° durante 15 min.
- 3.- Paso por alcohol de 96° durante 15 min.
- 4.- Paso por alcohol absoluto durante 30 min.
- 5.- Aclarado en xilol durante 1 hora.
- 6.- Paso por alcohol absoluto durante 30 min.
- 7.- Paso por alcohol de 96° durante 15 min.
- 8.- Paso por alcohol de 80° durante 15 min.^c
- 9.- Lavado en PBS (2 x 5 min.).
- 10- Bloqueo de la peroxidasa endógena en H₂O₂ al 0,3%, durante 30 min. a temperatura ambiente.
- 11- Lavado en PBS (3 x 10 min.).
- 12- Incubación en NGS al 10% durante 24 horas, para la eliminación de las señales de fondo no específicas (background).
- 13- Incubación en la 1ª capa (anti-PGFA), durante 3-4 días a 4°C (dilución 1/250).
- 14- Lavado en PBS (3 x 3 horas).

^cEstos pasos por los alcoholes se realizaron para la eliminación de lípidos de las membranas celulares formándose huecos que ayudan a la penetración de los anticuerpos.

- 15- Incubación en la 2ª capa (anti-IgG de ratón), durante 2 días a 4°C (dilución 1/100).
- 16- Lavado en PBS (3 x 3 horas).
- 17- Incubación en PAP, durante 24 horas a 4°C (dilución 1/700).
- 18- Lavado en PBS (3 x 3 horas).
- 19- Tratamiento con 3'3'-diaminobencidina tetrahidroclicóricu (DAB, Sigma) al 0,03 % en PBS, durante 5 min.
- 20- Revelado con DAB (0,03 %) / H₂O₂ (0,01 %), en PBS, durante 15 min.
- 21- Lavado en PBS (3 x 10 min.).
- 22- Montaje de las coroides sobre portaobjetos bañados en alumbre de cromo-gelatina, dejándolas secar.
- 23- Lavado en H₂O destilada.
- 24- Deshidratación en alcoholes de 96°, absoluto, y aclaramiento en xilol.
- 25- Montaje usando bálsamo de Canadá (Merck).

B.- Técnica de la PAP en montajes planos con anti-NF.

El procedimiento empleando con los anticuerpos para los tres neurofilamentos de distinto peso molecular (68, 160, 200) fue el mismo, variando únicamente cuando

se procedía a la incubación en la 1ª capa (anti-NF) el anti NF-68, anti NF-160 ó anti NF-200, respectivamente. La dilución a la que fueron empleados cada uno de ellos fue la siguiente:

- anti NF-68: 1/100
- anti NF-160: 1/100
- anti NF-200: 1/100

El protocolo empleado fue:

- 1.- Lavado en PBS.
- 2.- Paso por alcohol de 80° durante 15 min.
- 3.- Paso por alcohol de 96° durante 15 min.
- 4.- Paso por alcohol absoluto durante 30 min.
- 5.- Aclarado en xilol durante 1 hora.
- 6.- Paso por alcohol absoluto durante 30 min.
- 7.- Paso por alcohol de 96° durante 15 min.
- 8.- Paso por alcohol de 80° durante 15 min.
- 9.- Lavado en PBS (2 x 5 min.).
- 10- Bloqueo de la peroxidasa endógena en H₂O₂ al 0,3%, durante 30 min. a temperatura ambiente.
- 11- Lavado en PBS (3 x 10 min.).

- 12- Incubación en NGS al 10% durante 24 horas, para la eliminación de las señales de fondo no específicas (background).
- 13- Incubación en la 1ª capa (anti-NF), durante 3-4 días a 4°C (dilución dependiendo del anti NF utilizado).
- 14- Lavado en PBS (3 x 3 horas).
- 15- Incubación en la 2ª capa (anti-IgG de ratón), durante 2 días a 4°C (dilución 1/100).
- 16- Lavado en PBS (3 x 3 horas).
- 17- Incubación en PAP, durante 24 horas a 4°C (dilución 1/700).
- 18- Lavado en PBS (3 x 3 horas).
- 19- Tratamiento con 3'3'-diaminobencidina tetrahidroclicóricu (DAB, Sigma) al 0,03% en PBS, durante 5 min.
- 20- Revelado con DAB (0,03%)/ H₂O₂ (0,01%), en PBS, durante 15 min.
- 21- Lavado en PBS (3 x 10 min.).
- 22- Montaje de las coroides sobre portaobjetos bañados en alumbre de cromo-gelatina, dejándolas secar.
- 23- Lavado en H₂O destilada.
- 24- Deshidratación en alcoholes de 96°, absoluto, y aclaramiento en xilol.
- 25- Montaje usando bálsamo de Canadá.

4.- RESULTADOS

4.- RESULTADOS.

Para estudiar las fibras nerviosas coroideas hemos realizado montajes planos de coroides que han sido teñidos, como ya se indicó en el apartado de material y métodos, con dos tipos de técnicas.

En primer lugar hemos utilizado impregnaciones argénticas, y en segundo lugar, técnicas inmunohistoquímicas marcando la coroides con anticuerpos frente a dos tipos de filamentos intermedios: PGFA y NFs (NF-68, NF-160 y NF-200).

Las técnicas de plata nos permitirán comparar nuestros resultados con los hallazgos de los primeros trabajos realizados sobre inervación coroidea en la primera mitad de este siglo; mientras que con las técnicas inmunohistoquímicas pretendemos completar nuestras observaciones con plata realizando un estudio mucho más selectivo de las fibras nerviosas y de sus relaciones con las distintas estructuras de la coroides.

4.1.- ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LA INERVACIÓN COROIDEA CON TÉCNICAS DE PLATA.

4.1.1.- MORFOLOGÍA DE LAS FIBRAS NERVIOSAS.

Inicialmente, para el estudio de la morfología de las fibras nerviosas coroideas, hemos utilizado montajes planos de coroides, teñidos con la técnica del carbonato de plata de Del Río-Hortega (LISS, 1956)⁷¹, así como con la técnica para las neurofibrillas de Cajal (RAMÓN y CAJAL, 1933)⁹⁹.

Las técnicas de plata nos han permitido poner de manifiesto la presencia de dos grandes tipos de fibras nerviosas en la coroides: uno formado por fibras mielínicas y otro por fibras amielínicas. Las fibras mielínicas se situad en la capa más externa de la coroides, a nivel de la supracoroides; mientras que, las amielínicas se disponen en todas las capas coroideas.

Las *fibras mielínicas* se reducen intensamente por la plata, tomando una coloración pardo oscura debido a su vaina de mielina, como hemos podido demostrar con la técnica para neurofibrillas de Cajal (Fig. 1).

Desde la supracoroides las fibras mielínicas se van ramificando en otras fibras de menor calibre, que se introducen hacia las capas más internas de la coroides. A medida que se ramifican pierden progresivamente su vaina de mielina y se reducen menos por la plata, lo que nos permite observar, nuevamente con la técnica de Cajal, los núcleos de las células de Schwann sobre las fibras más finas (Fig. 1).

Así hemos podido comprobar que la mayor parte de las fibras nerviosas observadas en las capas coroides son de naturaleza *amielínica*. Estas fibras amielínicas se pueden a su vez subdividir en dos grandes grupos dependiendo de su situación con respecto a los vasos sanguíneos:

- un primer grupo al que denominaremos **fibras perivasculares**, formado por fibras nerviosas que se encuentran en íntimo contacto con los vasos, acompañándolos en todo su recorrido (Fig. 2);
- y un segundo grupo, constituido por fibras nerviosas independientes al trayecto de los vasos sanguíneos, al que hemos denominado como **fibras intervasculares** (Fig. 3).

4.1.1.1.- Fibras perivasculares.

En nuestras preparaciones hemos podido observar que la inervación corioidea es fundamentalmente vascular, realizándose a expensas sobre todo de las fibras

perivasculares (Fig. 2).

Estas fibras perivasculares proceden en su origen de los nervios ciliares cortos, que acompañan a las arterias ciliares cortas posteriores desde la vecindad del nervio óptico hasta su terminación en las venas vorticosas. Estos troncos nerviosos se ramifican siguiendo la distribución arterial y van disminuyendo de tamaño en su progresión a través del territorio coroideo, tanto en sentido postero-anterior como en profundidad.

Dentro de las fibras perivasculares hemos podido observar, con la modificación de Liss al carbonato de plata, tres subtipos de fibras morfológicamente diferenciables:

- fibras circulares (Fig. 4),
- fibras en abanico (Figs. 5 y 6),
- y fibras longitudinales (Fig. 5 y 6).

Las **fibras circulares**, son de tamaño grueso por lo que se reducen intensamente por la plata. Se disponen rodeando por su cara interna la pared externa de los vasos de grueso y mediano calibre, siendo mucho más abundantes en los vasos arteriales que en los venosos. Estas fibras rodean a los vasos a lo largo de todo su recorrido y son mucho más numerosas que los otros dos subtipos de fibras

perivasculares, constituyendo el tipo de fibra más abundante de todos los encontrados en la coroides (Fig. 4).

Las **fibras en abanico**, constituyen el segundo grupo de fibras perivasculares observado en nuestras preparaciones. Esta formado por fibras delicadas que parten desde las paredes laterales del vaso y se abren en forma de abanico hacia su superficie externa, presentando una débil reducción por la plata. Estas fibras se localizan en los vasos de calibre grueso, tanto en los arteriales como en los venosos; aunque sólo las hemos podido encontrar en algunas zonas del vaso, sin acompañarle en todo su recorrido, siendo por tanto discontinuas (Fig. 5 y 6).

Finalmente, las **fibras longitudinales** son aquellas, que como su nombre indica, recorren longitudinalmente la superficie del vaso. Su calibre es muy fino y se reducen minimamente por la plata. Se observan sobre los grandes vasos, tanto arteriales como venosos (Fig. 5 y 6).

4.1.1.2.- Fibras intervasculares.

Como ya indicamos al principio, reunimos bajo esta denominación al grupo de fibras que presentan un trayecto independiente al que siguen los vasos sanguíneos.

Dentro de este grupo de fibras podemos describir, por un lado, fibras que constituyen un sistema de plexos nerviosos que se sitúan en los diferentes estratos coroides; y por otro, una serie de fibras independientes situadas en la supracoroides que realizan conexiones vasculares.

A.- *Plexos nerviosos coroides.*

Dependiendo de la situación de las fibras en el espesor coroidal, hemos podido diferenciar tres niveles de plexos: interno, medio y externo.

El **plexo interno** está constituido por fibras de calibre fino, muy poco numerosas, que se disponen próximas al epitelio pigmentario de la retina (E.P.R.), constituyendo una delicada red nerviosa. Estas fibras no parecen contactar en ningún punto con el E.P.R. y presentan una débil reducción con la plata (Fig. 7).

El **plexo medio**, está constituido por fibras de un calibre mayor que las del plexo interno. Estas fibras se sitúan formando una malla por debajo y entre los vasos coroides de calibre mediano. Este plexo representa la malla más voluminosa y espesa de fibras (Fig. 7).

Finalmente, el **plexo externo**, es el que se dispone más superficialmente dentro de la coroides. Esta formado por fibras muy gruesas que se sitúan sobre y entre los vasos coroides de mayor tamaño. Los haces gruesos de este plexo se dividen tanto dicotómicamente como en forma de rama, presentando una fuerte reducción por la plata (Fig. 8).

B.- *Fibras nerviosas intervasculares independientes.*

Además de estos tres plexos bien diferenciados de fibras intervasculares, también hemos podido observar fibras que sin seguir la trayectoria de los vasos y sin formar parte de un plexo determinado, se relacionan con los vasos presentando diferentes morfologías. Estas fibras se sitúan fundamentalmente en la supracoroides y en la capa de los grandes vasos.

Dentro de este grupo de fibras nos encontramos en primer lugar, con unas fibras gruesas, reducidas intensamente por la plata, con *forma lanceolada o en llama*, que se sitúan entre dos vasos próximos de calibre grueso. Éstas, al aproximarse al vaso se dividen en otras mucho más finas, que llegan a contactar con la pared externa del mismo. Se pueden observar de forma aislada pero generalmente se sitúan en grupos de tres o cuatro fibras (Fig. 9).

Podemos observar también un segundo subtipo de fibra que se proyecta tanto de *forma paralela* como en *abanico*, sobre las paredes de los grandes vasos coroideos. Estas fibras son muy finas en comparación con las anteriores, pero a pesar de su pequeño calibre pueden ser perfectamente individualizadas porque se reducen intensamente por la plata y presentan un recorrido de considerable longitud sobre los vasos de gran calibre (Fig. 10).

Por último, dentro de las fibras independientes que no constituyen verdaderos plexos, hemos observado un tercer subtipo de fibra, que se dispone entre los vasos de gran calibre realizando contactos con ellos. Estas fibras presentan una *morfología helicoidal* o en *sacacorchos*; también se reducen intensamente por la plata, siendo su calibre intermedio entre las dos anteriores (Fig. 11).

4.1.2.- MORFOLOGÍA DE LOS TIPOS CELULARES ASOCIADOS A LAS FIBRAS NERVIOSAS.

4.1.2.1.- Células ganglionares coroideas.

Tanto con la técnica de Liss como con el método de Cajal, hemos encontrado en todas las coroides estudiadas, células ganglionares,

Estas células ganglionares se sitúan fundamentalmente en la proximidad de los grandes vasos y son de tipo bipolar. Presentan un cuerpo celular globoso del que parten dos prolongaciones que a su vez, en ocasiones, se dividen dicotómicamente dirigiéndose sus ramas a las paredes vasculares. Las células se reducen intensamente por la plata no permitiendo la visualización al microscopio ni de su núcleo ni del nucléolo (Fig. 12).

Generalmente se observan de forma aislada, pero en alguna ocasión las hemos visto agrupadas constituyendo un conjunto de dos o mas células.

Además de situarse próximas a las paredes de los grandes vasos, y por tanto cercanas a las fibras perivasculares circulares, también se encuentran próximas a los plexos de fibras nerviosas intervasculares; aunque no hemos podido observar una conexión directa entre las células ganglionares y las fibras nerviosas coroideas.

4.1.2.2.- Melanocitos coroideos.

Al igual que ocurría con las células ganglionares, hemos podido demostrar la presencia de melanocitos en la coroides con las dos técnicas de plata empleadas.

Los melanocitos están presentes en las distintas capas coroideas aunque la mayor densidad de ellos se encuentra en la supracoroides y en la capa de los grandes

vasos. Estas células presentan una morfología estrellada y sus prolongaciones se interconexionan entre sí formando una red tridimensional a lo largo de todo el espesor coroideo. Esta red se demuestra sobre todo en las preparaciones teñidas con el método para neurofibrillas de Cajal (Fig. 13).

Dentro de ellos, hemos encontrado tres subtipos celulares dependiendo de su tamaño: grandes, medianos y pequeños. Todos ellos se sitúan próximos a los vasos y entre ellos; también cerca de las fibras nerviosas (tanto peri como intervasculares), y en ocasiones se acercan mucho a las mismas. Sin embargo, no hemos podido observar ningún contacto directo entre los melanocitos y las fibras nerviosas coroideas (Fig. 14).

4.2.-. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LA INERVACIÓN COROIDEA CON TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS.

4.2.1.- ESTUDIO CON ANTI-PGFA.

4.2.1.1.- Localización de las fibras nerviosas

El primer anticuerpo que hemos utilizado para demostrar las fibras nerviosas coroideas, ha sido el anti-PGFA. Estas preparaciones nos han permitido constatar que

en toda la extensión de la coroides se observa señal PGFA(+) [^f+] (en la zona superior, inferior, temporal y nasal). Esta inmunorreactividad positiva la hemos podido poner de manifiesto solamente a nivel de la capa de los grandes y medianos vasos, no pudiendo encontrar reacción a nivel de la coriocapilar (Fig. 15).

La señal PGFA(+) se encuentra fundamentalmente en relación con las paredes vasculares arteriales y venosas, demostrando una vez más, que la inervación coroidea es de predominio vascular (Figs. 15 y 16). Todos los vasos coroideos, a excepción de los capilares, presentan una señal PGFA(+) que los sigue en todo su recorrido y que va delimitando el contorno del árbol vascular desde su origen en las arterias ciliares cortas posteriores hasta su fin en las venas vorticosas (Fig. 15).

Esta señal PGFA(+) que rodea los vasos es debida a la presencia de múltiples fibras que envuelven y siguen al vaso sanguíneo en su trayectoria longitudinal constituyendo la inervación perivascular. Aunque es una señal débil puede observarse a lo largo de todo el recorrido del vaso (Figs. 15 y 16).

Además de esta señal perivascular positiva, también existe una señal PGFA(+) independiente a la trayectoria de los vasos que correspondería a la

^f La intensidad de la reacción se indica a lo largo de todo el estudio mediante un número de cruces, que varía entre 1 y 4, encerradas entre corchetes, lo que nos permite comparar las distintas inmunorreactividades entre sí

inervación intervascular. Esta señal intervascular [++] se sitúa entre los vasos y es de mayor intensidad que la inmunorreacción perivascular [+], pudiéndose delimitar mejor las fibras intervasculares que las perivasculares (Fig. 17).

En la totalidad de la coroides podemos considerar que la señal intervascular es muy escasa comparada con la perivascular, pero mucho más intensa.

4.2.1.2.- Morfología y distribución de las fibras nerviosas.

Como acabamos de ver, la diferente localización de las fibras nerviosas en relación con los vasos, nos permite clasificar las fibras nerviosas de la coroides del conejo en dos grandes grupos: fibras perivasculares, y fibras intervasculares

A.- *Fibras perivasculares.*

Al observar un montaje plano de coroides marcado con anti-PGFA, podemos afirmar que la inmunorreactividad perivascular está determinada por la sumación de señales procedentes de fibras nerviosas individuales (Fig. 18).

Las fibras nerviosas perivasculares de la coroides del conejo más numerosas son aquellas que rodean a los vasos sanguíneos desde su origen en las grandes

arterias ciliares hasta el sistema venoso. Son fibras de calibre fino que envuelven y rodean al vaso en toda su trayectoria, se ramifican con él y van disminuyendo de grosor a medida que profundizamos en el espesor coroideo desde la zona superficial, existiendo además una disminución en sentido postero-anterior (Fig. 18).

Estas fibras perivasculares finas son las responsables de la señal PGFA(+) perivascular, o de fondo, que encontramos en toda la extensión coroidea (Fig. 18).

Además de estas fibras perivasculares finas, hemos demostrado otras fibras de disposición perivascular, que presentan un mayor grosor que el de las descritas anteriormente. Estas fibras se agrupan en determinadas zonas presentando una trayectoria envolvente horizontal sobre los vasos de mediano calibre (Figs. 19 y 20). Se diferencian con facilidad de las de calibre fino porque aunque ambas están presentes simultáneamente, éstas últimas poseen una reactividad PGFA(+) ligeramente superior (Fig. 20).

B.- *Fibras intervasculares.*

Además de las fibras perivasculares que tienen un contacto permanente con las paredes de los vasos sanguíneos, también hemos observado en nuestras preparaciones coroides, unas fibras que se sitúan entre los vasos y hacen contactos

ocasionales con las paredes de los mismos, presentando una señal PGFA(+) intensa [++], superior a la de las fibras perivasculares [+] (Fig. 21).

Estas fibras, a las que hemos denominado intervasculares por su situación con respecto al árbol vascular, no forman plexos, situándose de forma independiente entre los vasos, ramificándose progresivamente a la vez que se aproximan hasta llegar a establecer contacto ocasionalmente con ellos (Fig. 19).

Dependiendo de su grosor están constituidas por un mayor o menor número de fibras individuales. No poseen una configuración especial, salvo en contadas ocasiones, en las que hemos observado que se proyectan sobre las paredes de los vasos de mediano y grueso calibre, abriéndose en abanico en sus proximidades, llegando a contactar con las paredes de los mismos (Fig. 22).

4.2.1.3.- Marcaje de otros elementos coroideos.

Finalmente, como era de esperar, dado que la especificidad de la proteína GFA sólo permite, en la coroides, el marcaje de las células de Schwann, no hemos podido poner de manifiesto elementos celulares presentes en la coroides, como son las células ganglionares o los melanocitos.

4.2.2.- ESTUDIOS EMPLEANDO ANTICUERPOS CONTRA NEUROFILAMENTOS.

4.2.2.1.- ESTUDIO CON ANTI NF-68.

A.- Localización de las fibras nerviosas.

Para determinar la localización de las fibras nerviosas con anti-neurofilamentos, hemos utilizado, en primer lugar, el anticuerpo frente al neurofilamento de 68 kd, que es el de menor peso molecular de los 3 NFs empleados en este trabajo..

En nuestras preparaciones se observa como la señal NF-68(+) es bastante débil [++], extendiéndose por todo el territorio coroideo, tanto en la zona superior e inferior, como en la temporal y nasal (Fig. 23). Esta señal aumenta considerablemente a nivel del cuerpo ciliar y en la zona de transición entre la coroides y el mismo [++++] (Fig. 24).

La inmunorreactividad NF-68(+) la hemos podido poner de manifiesto en la coroides sólo en las capas de los grandes y medianos vasos, estando ausente de señal

la coriocapilar. En todas las preparaciones hemos podido constatar que la señal NF-68(+) se encuentra en la coroides relacionada fundamentalmente con las paredes vasculares, tanto arteriales como venosas, lo que demuestra una vez más que la innervación corioidea es de predominio vascular (Fig. 23).

Todo el árbol vascular corioideo, a excepción como ya hemos indicado de la coriocapilar, presenta una débil señal NF-68(+) [+]. Ésta sigue a los vasos en todo su recorrido desde su origen en las arterias ciliares cortas posteriores hasta las venas vorticosas; observándose en todas las ramificaciones vasculares, de tal forma, que reproduce el patrón del árbol vascular corioideo (Fig. 23).

Asimismo, además de esta inmunorreactividad perivascular predominante en todas las preparaciones, existe otra señal más intensa [++-] e independientemente de las estructuras vasculares, aunque se relacione con ellas en ocasiones (Fig. 25). Esta señal es debida a las fibras que constituyen la innervación intervascular, que aparece como muy escasa y de difícil observación con esta técnica (Fig. 25).

Por último, en la zona de transición de la coroides con el cuerpo ciliar, y a nivel de este, encontramos una señal NF-68(+) mucho más fuerte [++++] que las anteriormente descritas. La inmunorreactividad NF-68(+) en esta zona cilio-corioidea se debe a la presencia de múltiples fibras nerviosas existentes en esta zona que no tienen relación directa con los vasos constituyendo plexos independientes (Fig. 24).

B.- Morfología y distribución de las fibras nerviosas.

También al emplear anti NF-68, nuevamente volvemos a encontrarnos con los dos grandes grupos de fibras coroideas: las fibras perivasculares, y las fibras intervasculares.

*** Fibras perivasculares.**

Al observar un montaje plano de coroides marcado con anti NF-68 podemos afirmar que la inmunorreactividad perivascular está determinada por la sumación de las señales procedentes de fibras nerviosas individuales agrupadas entre sí (Fig. 26).

A pesar de la débil señal que existe alrededor de los vasos podemos afirmar que la mayor parte de las fibras nerviosas que observamos en la coroides de conejo con anti NF-68, son fibras perivasculares. Estas fibras rodean a los vasos coroideos de mediano y gran tamaño desde su origen hasta su fin en el sistema venoso, con excepción de los capilares que forman la coriocapilar. Asimismo, los acompañan desde la superficie corioidea hacia la profundidad, y desde la coroides posterior a la anterior; ramificándose y disminuyendo de calibre con ellos, constituyendo a modo de cubierta del árbol vascular (Fig. 26).

*** Fibras intervasculares.**

Además de las fibras perivasculares, las cuales son difíciles de definir de forma aislada, hemos observado otras fibras de un calibre fino, que presentan, sin embargo, una gran definición por su mayor inmunorreactividad positiva frente el anti NF-68 [++-] (Fig. 27).

Estas fibras son muy escasas y su característica fundamental es su apariencia discontinua (Fig. 25). Hemos observado su recorrido en toda la extensión coroidea desde la zona de transición con el cuerpo ciliar hasta el polo posterior, pero no hemos podido seguir toda la trayectoria de la fibra porque desaparece en múltiples ocasiones (Fig. 25).

Asimismo, en determinados tramos de su recorrido podemos observar que las fibras tienen una naturaleza doble, siendo una de las ramas más fina que la otra. Los dos filamentos que forman la fibra, se separan y juntan alternativamente, sin seguir un patrón característico (Fig. 28).

También en ocasiones, estas fibras intervasculares, hacen contacto con las paredes vasculares sin adoptar ninguna terminación especial (Fig. 29).

Si comparamos su número con las fibras perivasculares, vemos que son extremadamente escasas cuando se marca la coroides con anti NF-68 (Fig. 25).

Por último, al observar la zona de transición entre la coroides y el cuerpo ciliar, encontramos la señal más intensa [++++] que obtenemos marcando la coroides con este anticuerpo, debido al gran acumulo de fibras nerviosas que están formando plexos en esta localización (Fig. 24).

En el cuerpo ciliar hemos observado la presencia de un fascículo nervioso grueso, y de forma acintada que penetra en el mismo, recorriéndolo circunferencialmente (Figs. 30 y 31). Este fascículo presenta una señal NF-68 fuertemente positiva, y está formado por la reunión de múltiples fibras de calibre más fino, en un número aproximado de 50; y se corresponde con un nervio ciliar largo que está penetrando en la úvea a este nivel (Fig. 30 y 31).

Este fascículo es muy similar a otros que observamos de forma muy aislada e incompleta en la superficie de la coroides, muy cerca de los grandes vasos, y que pensamos pueden corresponder a fragmentos de nervios ciliares largos que han quedado rotos en el momento en el que realizamos la disección coroidea (Fig. 32).

De los nervios ciliares largos que recorren circunferencialmente el cuerpo ciliar, parten múltiples fibras que se ramifican muy abundantemente entre los procesos ciliares constituyendo auténticos plexos. Son fibras muy bien definidas, de calibre fino y fuertemente inmunopositivas con anti NF-68 [++++] Figs. 24,30 y 31).

Alguna de las ramas de estas fibras ciliares realizan un largo recorrido y se introducen en el territorio coroideo (Fig. 33). En alguna ocasión estas fibras cilio-coroideas giran para regresar hacia el territorio ciliar, adquiriendo su trayectoria la forma de una uve (Fig. 34).

C.- *Marcaje de otros elementos coroideos.*

Por último, no hemos podido identificar, ni en la coroides ni en la zona de transición con el cuerpo ciliar, ningún cuerpo celular ganglionar marcando las preparaciones con el anticuerpo anti NF-68; sucediendo lo mismo con los melanocitos.

4.2.2.2.- ESTUDIO CON ANTI NF-160.

A.- *Localización de las fibras nerviosas.*

En todas las coroides planas teñidas con anticuerpos frente al NF-160, se pueden observar una inmunorreacción positiva bastante intensa [+ + +] a lo largo de

toda la extensión del tejido, es decir, en todos sus cuadrantes (nasal, temporal, superior e inferior). Esta fuerte señal permite que las fibras coroideas se puedan observar con una clara definición (Fig. 35).

Al estudiar la coroides con esta técnica, observamos que la inmunorreactividad NF-160(+) vuelve a estar limitada a las capas de los grandes y medianos vasos, estando ausente, por lo tanto, de la coriocapilar. Una vez más, el empleo de este nuevo anticuerpo nos permite demostrar cómo la inervación coroidea es fundamentalmente vascular, ya que en todas las preparaciones marcadas con anti NF-160, la inmunorreactividad se encuentra en el tejido coroideo, mayoritariamente en relación con las paredes vasculares, arteriales y venosas (Fig. 35).

Como ya hemos indicado anteriormente, con excepción de la coriocapilar, encontramos que todo el árbol vascular coroideo presenta una intensa señal NF-160(+) [+++] que sigue a los vasos desde su origen arterial hasta el territorio venoso. Esta señal se puede observar en todas las ramas vasculares, de tal forma que reproduce el patrón del árbol vascular coroideo (Fig. 35).

También con este nuevo neurofilamento, hemos podido poner de manifiesto la existencia, además de la señal perivascular, de una inmunorreacción

independiente de los vasos aunque se relacione con ellos en múltiples ocasiones, y que se corresponde con las fibras intervasculares (Fig. 36). Esta señal intervascular es muy frecuente y se puede ver con mucha facilidad al emplear como marcador el anti NF-160; siendo la intensidad de reacción NF-160(+) igual en las fibras que rodean los vasos sanguíneos y en las intervasculares (Fig. 36).

Por último, también apreciamos en la zona de transición entre coroides y cuerpo ciliar, una intensa señal NF-160(+) debida a la existencia de plexos nerviosos localizados a este nivel (Fig. 37 y 38).

B.- *Morfología y distribución de las fibras nerviosas.*

Una vez más, apoyándonos en la diferente localización de las fibras nerviosas en su relación con los vasos, podemos subdividirlas para su estudio en dos grupos: perivasculares e intervasculares (Fig. 36).

*** Fibras perivasculares.**

Al observar las preparaciones marcadas con anti NF-160, se puede apreciar como los vasos están rodeados de unos fascículos nerviosos acintados que rodean su

circunferencia en todo su recorrido (Fig. 39).

Estos fascículos nerviosos están formados por múltiples fibras nerviosas que se pueden individualizar perfectamente al utilizar los objetivos de mayor aumento (40x) (Fig. 40).

La sumación de la señal de estas fibras independientes produce la imagen de fascículo acintado que observamos inicialmente con los objetivos de menor aumento (3,2x; 10x) (Fig. 39). Como la señal de cada fibra individual es fuerte, la unión de todas las fibras produce una señal perivascular de gran intensidad [+ + +] (Fig. 41).

Estas fibras perivasculares rodean a los vasos de mediano y gran tamaño, desde su origen hasta el sistema venoso con excepción de los capilares de la coriocapilar. Se localizan desde la superficie hasta la profundidad coroidea, y desde la zona posterior a la anterior (Figs. 35 y 40).

Como siguen a los vasos en todo su recorrido, ramificándose y disminuyendo de calibre a la vez que ellos, y gracias a que presentan una señal muy definida, el marcaje de la coroides con anti NF-160 dibuja perfectamente el árbol vascular coroideo (Figs. 35 y 41).

Por último, también se observan en las paredes de los grandes vasos (arteriales y venosos), unas fibrillas extremadamente finas que se sitúan cerca de la

pared externa del vaso sanguíneo presentando forma de diapasón. Estas fibras no se sitúan a lo largo de todo el recorrido del vaso, por lo que son discontinuas, aunque se repiten periódicamente (Fig. 42).

*** Fibras intervasculares.**

Dentro de este grupo de fibras, hemos observado diferentes tipos que se agrupan entre sí formando fascículos nerviosos.

Los fascículos más grandes son los nervios ciliares largos. Estos nervios se observan en la superficie coroidea a nivel de la supracoroides y cerca de la capa de los grandes vasos. Están formados por un gran número de fibras fuertemente NF-160(+) [++++] (aproximadamente en número de 50 a 70), que se agrupan dentro del fascículo nervioso constituyendo una especie de cinta por su apariencia aplanada (Fig. 43). No se pueden observar en toda la extensión coroidea, encontrándolos de forma aislada e incompleta debido a la fragmentación sufrida al realizar la disección para separar la coroides de la esclera.

Asimismo, también de forma incompleta y aislada, existen unos fascículos nerviosos, constituidos por un número aproximado de 10 a 20 fibras con gran señal

NF-160(+) [++++], que se sitúan en la capa de los grandes vasos. Estos fascículos se ramifican en otros de menor grosor de 3-4 fibras, que siguen estando bien definidos por su inmunorreacción positiva, que a su vez dan ramas independientes de calibre extremadamente fino que todavía pueden seguirse por su buena señal y que llegan finalmente a contactar con las paredes vasculares (Fig. 44A,B). En alguna ocasión estos fascículos de 3-4 fibras, presentan varicosidades o ensanchamiento (Fig. 44C)

Aunque estas agrupaciones de fibras estaban próximas a los fascículos nerviosos acintados correspondientes a los nervios ciliares largos, no hemos podido demostrar que derivasen de ellos.

En ocasiones estos fascículos se sitúan paralelos a la superficie de un gran vaso y lo acompañan a lo largo de su recorrido formando un sistema para-arterial. De esta fibra gruesa parten fibras más finas que llegan a contactar con la superficie vascular, sin que para realizar este contacto adopte una configuración o terminación especial (Fig. 45).

Además de estos fascículos de fibras, hemos observado fibras que presentan una distribución ecuatorial apareciendo de forma aislada e independiente a lo largo de la supracoroides (Fig. 46A). Poseen una inmunorreactividad NF-160(+) muy

intensa, siendo su reacción la más marcada de toda la coroides. La elevada tinción de estas fibras produce una imagen tan compacta que no permite visualizar estructuras dentro de ella. Sin embargo, presentan como característica definitoria unos hinchamientos periódicos a lo largo de su recorrido (Fig. 46A,B).

Aparte de estas fibras nerviosas, hemos encontrado otros fascículos nerviosos que presentan un gran recorrido dentro de la coroides. Estos fascículos se originan en los plexos situados en la zona de transición entre el cuerpo ciliar y la coroides. En esta zona hemos observado una gran cantidad de fibras intensamente NF-160(+) [+ + +] que constituyen extensos entramados fibrosos (Fig. 47).

De estos plexos cilio-coroideos, parten fibras que llegan a la coroides y que penetran en ella distribuyéndose longitudinalmente a lo largo de toda su extensión. Estas fibras a las que denominamos de largo recorrido, alcanzan la coroides de forma muy diversa.

Algunas aparecen como fibras individuales que nacen en el plexo de la zona de transición y penetran sin formar fascículos nerviosos en la coroides, y que tras un largo recorrido intracoroideo, se ramifican y desaparecen. Estas fibras individuales son de calibre muy fino y presentan una inmunorreactividad muy positiva frente al anti NF-160 [+ + + +]. En ciertos tramos de su recorrido se puede observar que son

fibras dobles, siendo los filamentos que las forman de distinto grosor. Asimismo, y también solamente en algunos tramos, presentan engrosamientos a modo de varicosidades (Figs. 48A,B).

Otras de estas fibras, derivadas de las ramificaciones de los plexos de transición cilio-coroideos, penetran en la coroides, no como fibras individuales sino formando fascículos de 10 a 15 fibras, que una vez realizado un pequeño recorrido intracoroideo comienzan a ramificarse. Las ramas de estos fascículos son las que presentan un largo recorrido dentro de la coroides, pudiendo ser visualizadas en todo momento, sin llegar a desaparecer como lo hacían las fibras individuales (Fig. 49). Presentan una gran señal NF-160(+) [++++], y a medida que recorren la coroides en sentido antero-posterior, se van a reunir con otras ramas de largo recorrido de los territorios vecinos. De esta forma, estos fascículos nerviosos pueden llegar a ser dobles, triples o múltiples, dependiendo del número de fibras que vayan juntas en un determinado tramo de su recorrido (Figs. 49, 50). Generalmente, al lado de una fibra de calibre muy fina va otra de grosor mayor y señal NF-160(+) más fuerte. Asimismo, estas fibras de calibre grueso sufren ensachamientos a modo de varicosidades en tramos intermitentes de su trayecto (Fig. 50)

Todas estas fibras a lo largo de su recorrido intracarotideo hacen contacto con los vasos en múltiples ocasiones, sin adquirir ninguna configuración ni terminación especial (Fig. 51A,B).

C.- *Marcaje de otros elementos coroides.*

Al marcar la coroides con anti NF-160 hemos podido poner de manifiesto la presencia de células ganglionares (Figs. 52,53,54,55).

Estas células son muy escasas y se encuentran formando parte de los plexos de fibras intervasculares (Figs. 52,53,54). Tienen una naturaleza bipolar (Figs. 52,53,54), presentando un cuerpo fusiforme con núcleo NF-160(-) localizado centralmente, partiendo de cada lado de su soma dos prolongaciones con inmunoreacción NF-160(+) bastante intensa [+++].

Aunque las hemos encontrado en ocasiones de forma aislada, lo más frecuente es observarlas agrupadas en acúmulos de dos o tres células.

Sin embargo, en ocasiones, también hemos observado células ganglionares de tipo multipolar, de cuyo cuerpo parten 3-4 prolongaciones que van a constituir parte de los plexos intervasculares (Fig. 54).

Considerando toda la extensión corioidea, las células ganglionares marcadas con anti NF-160, han sido pocas y sin una distribución preferencial por algún área en particular.

Finalmente, con el empleo de este anticuerpo no se ponen de manifiesto los melanocitos existentes en la coroides.

4.2.2.3.- ESTUDIO CON ANTI NF-200.

A.- *Localización de las fibras nerviosas.*

Cuando para el estudio de la inervación coroidea, los montajes planos de coroides son inmunoteñidos con anti NF-200, se puede observar como vuelve a existir una reacción positiva en todos los territorios de la coroides (temporal, nasal, inferior y superior). Esta inmunorreactividad produce una señal de intensidad muy elevada [++++], que se localiza a nivel de las capas de los grandes y medianos vasos, estando ausente en la coriocapilar (Fig. 56).

La intensidad de la señal se debe tanto a la presencia de múltiples fibras nerviosas como a la de numerosas células NF-200(+) (Fig. 57), que no se marcaban en los controles correspondientes (Fig. 58).

La inmunoreacción NF-200(+), se encuentra sobre todo en relación con las paredes vasculares arteriales y venosas, lo que nuevamente, pone de relieve cómo la inervación coroidea es fundamentalmente vascular (Fig. 59).

Los vasos coroides se encuentran rodeados por múltiples fibrillas de carácter estremadamente fino, desde su origen arterial hasta el territorio venoso. Estas fibras

envuelven a los vasos grandes y medianos, siguiéndolos en su trayecto longitudinal, ramificándose con ellos (Fig. 60).

Asimismo, en los vasos coroideos de mediano y gran tamaño, encontramos un gran número de células de morfología estrellada que también los acompañan a lo largo de su recorrido y los siguen por sus ramificaciones, constituyendo un auténtico soporte del árbol vascular coroideo. Estas células se han identificado como los melanocitos coroideos (Fig. 57).

Por lo tanto, la señal procedente de las fibrillas perivasculares, unida a la de los melanocitos, da lugar a una inmunorreactividad NF-200(+) muy intensa [++++] a lo largo de todas las ramas vasculares con excepción de los capilares que forman la coriocapilar (Figs. 56, 59).

Además de esta inmunorreactividad perivascular, también aparece una señal NF-200(+) independiente de los vasos (aunque se relaciona en ocasiones con ellos), y que presenta una reacción lo suficientemente intensa [+++] como para que pueda ser discriminada sin dificultad. Esta señal NF-200(+) procede de las llamadas fibras intervasculares, y es de menor intensidad si se compara con la señal perivascular (Fig. 61).

También con el empleo de este anticuerpo, en la zona de transición entre coroides y cuerpo ciliar se observa señal anti NF-200(+). Reacción que es de una intensidad moderada [+++] si se compara con la perivascular; y que procede de fibras nerviosas aisladas localizadas en esta área (Fig. 62).

B.- *Morfología y distribución de las fibras nerviosas.*

Como ya hemos explicado al estudiar la localización de las fibras nerviosas en la coroides, podemos clasificarlas para su estudio basándonos en la diferente localización en: fibras perivasculares y fibras intervasculares (Fig. 61).

*** Fibras perivasculares.**

Si observamos un montaje plano de coroides marcado con anti NF-200, podemos afirmar que la inmunorreactividad NF-200(+) perivascular está determinada por la sucesión de señales procedentes de fibras nerviosas individuales agrupadas. Así hemos podido demostrar la existencia de múltiples fibrillas NF-200 inmunopositivas, de calibre fino y señal intensa [++++], que se agrupan rodeando a los vasos de mediano y gran tamaño, desde el sistema arterial hasta el venoso con excepción de

la coriocalilar (Figs. 59,60).

Estas fibrillas siguen a los vasos desde la supracoroides hasta la coriocalilar, y desde la zona posterior hasta la zona de transición cilio-coroidea. Se pueden observar tanto en vasos arteriales como venosos, con excepción de la coriocalilar, como ya hemos dicho anteriormente (Fig. 56).

Dado que la señal que presentan estas fibrillas es bastante intensa [++++], unido a que siguen a los vasos en todo su recorrido ramificándose y disminuyendo de tamaño a la vez que ellos, estas fibras dibujan con perfección el árbol vascular corioideo en toda su extensión (Fig. 59).

Asimismo, estas fibras que rodean a los vasos, se relacionan en múltiples ocasiones con las fibras de vasos próximos llegando a contactar entre ellas (Fig. 63).

En algunos sectores, en las paredes de los grandes vasos arteriales y venosos, hemos puesto de manifiesto unas fibras muy finas que partiendo de las paredes laterales del vaso se agrupan a modo de collar y lo rodean. Estas fibrillas no se disponen a lo largo de todo el recorrido del vaso, siendo por tanto discontinuas, y presentan un calibre extremadamente fino (Fig. 64).

Por último, en la luz de las bifurcaciones de los grandes vasos, se forman auténticos entramados de fibras procedentes de las dos ramas de la bifurcación (Fig. 65).

*** Fibras intervasculares.**

Al estudiar los montajes planos de coroides con anti NF-200 hemos observado múltiples fibras intervasculares. Estas fibras se agrupan entre sí formando en ocasiones fascículos nerviosos (Fig. 66).

Los fascículos más grandes que hemos puesto de manifiesto con este marcador, se observan en la supracoroides, cerca de la capa de los grandes vasos. Se corresponden con los nervios ciliares largos, estando formados por un gran número de fibras (~80), intensamente NF-200(+) [+ + + +], que se agrupan dentro del fascículo nervioso constituyendo una especie de cinta por su apariencia aplanada (Fig. 67).

Estas grandes agrupaciones de fibras no se pueden observar en toda la extensión corioidea, encontrándolas de forma aislada e incompleta, lo que se podría deber a su fragmentación al realizar la disección corioidea y separar esta capa de la esclera a la que esta fuertemente adherida.

Además de estos gruesos fascículos acintandos, en la coroides nos encontramos con otros fascículos constituidos por un número menor de fibrillas (~5 a 10), también con una señal NF-200(+) intensa [+ + +], y morfología acintada.

Asimismo, al igual que los nervios ciliares largos, no se observan en toda la extensión coroidea, poniéndose de manifiesto sólo de forma inconstante; siempre próximos a los grandes vasos coroides (Fig. 68).

En algunas ocasiones hemos podido observar algún fascículo, de aproximadamente 10 fibras nerviosas, que se sitúa paralelo a la cara externa de un gran vaso, formando un sistema para-arterial acompañándolo a lo largo de su recorrido (Fig. 69). De esta fibra nerviosa gruesa, acintada e intensamente NF-200(+), parten fibras finas que llegan a contactar con la superficie vascular, sin adoptar su terminación una morfología especial ni configuración propia (Fig. 70).

También los fascículos paravasculares, como ocurre con los próximos a los grandes vasos, se ramifican en otros fascículos nervioso menos gruesos (de ~5 fibras), muy definidos por su señal inmunopositiva [+++], que a su vez van dando ramas individuales de calibre extremadamente fino, que pueden ser perfectamente seguidas en su trayectoria por su intensa señal NF-200(+), y que posteriormente, a medida que se ramifican, van efectuando contactos con las paredes vasculares sin adoptar terminaciones con morfología especial (Figs. 70 y 71).

Estos fascículos nerviosos intervasculares, podrían derivar de los nervios ciliares largos, los cuales desde la supracoroides darían ramas en la capa de los grandes vasos que posteriormente se ramifican progresivamente penetrando en

profundidad hacia la capa de los medianos vasos, dando de forma constante ramas vasculares hijas.

Además de estos fascículos nerviosos, se ha podido poner de manifiesto, la existencia de fibras intervasculares originadas de fibras nerviosas de la zona de transición cilio-coroidea. En esta región, con el empleo de anti NF-200, prácticamente no se observan fascículos nerviosos, y cuando estos se ponen de manifiesto se encuentran de forma aislada sin constituir plexos nerviosos (Figs. 62, 72).

Ocasionalmente, al estudiar la zona de transición cilio-coroidea, encontramos fascículos nerviosos formados por aproximadamente 10 fibras con una buena señal NF-200(+) [+++]. Estos fascículos son similares a los encontrados próximos a los grandes vasos coroideos: poseen forma de cinta aplanada y se ramifican en otros fascículos también acintados (con ~5 fibras) (Fig. 73). Estas fibras, son asimismo, bastante inmunopositivas [+++], y a su vez dan ramas hijas que penetran en el territorio coroideo (Fig. 73). Una vez que alcanzan la coroides éstas presentan un largo recorrido, aunque no se las puede seguir a lo largo de toda la extensión coroidea hacia la zona posterior, ya que terminan por desaparecer (Fig. 74).

Las fibras de largo recorrido marcadas con anti NF-200, pueden presentar una naturaleza doble o triple, y se ramifican ampliamente, haciendo múltiples contactos con los vasos y con las fibras de largo recorrido próximas. Al aproximarse a los vasos no adquieren ninguna disposición especial, ni configuración propia (Fig. 75).

Con el empleo de este anticuerpo, en estas fibras largas, no hemos puesto de manifiesto ningún tipo de engrosamiento en forma de varicosidad.

C.- *Marcaje de otros elementos coroideos.*

Marcando la coroides de conejo con anti NF-200 se pueden observar dos tipos celulares, relacionados con las fibras nerviosas coroideas: las células ganglionares y, los melanocitos.

*** *Células ganglionares coroideas.***

En las coroides estudiadas con anti NF-200 se observan un número escaso de células ganglionares. Estas células se sitúan fundamentalmente en la coroides periférica, muy próximas a la zona de transición con el cuerpo ciliar (Fig. 76).

Son células que presentan una morfología generalmente multipolar, con un cuerpo triangular inmunopositivo con núcleo central NF-200(-), y tres o cuatro prolongaciones alargadas que parten del soma en varias direcciones (Fig. 76). En algunas ocasiones, pueden presentar morfología bipolar, con el cuerpo fusiforme partiendo dos prolongaciones alargadas de cada polo (Fig. 76).

Tanto las células ganglionares multipolares como las bipolares, se suelen encontrar reunidas en grupos de 2 ó 3 células, aunque también las hemos encontrado de forma aislada (Fig. 76).

Las células ganglionares forman parte de los plexos nerviosos constituidos por las fibras intervasculares.

*** Melanocitos coroideos.**

Finalmente, al estudiar las coroides marcadas con anti NF-200, hemos podido observar como en toda la extensión del tejido (superior-inferior, nasal-temporal), el tipo celular más numeroso puesto de manifiesto con este anticuerpo, son los melanocitos (Figs. 57, 77A,B,C).

Estas células pigmentadas tienen una señal NF-200(+) bastante intensa [++++]. Se sitúan fundamentalmente alrededor de los vasos de mediano y gran tamaño, rodeándolos a modo de soporte a lo largo de su recorrido. Forman parte,

junto con las fibras perivasculares, de la señal NF-200(+) que rodea a los vasos (Figs. 57,77A,B,C).

Las podemos observar como células de diferentes tamaños, y con límites poco definidos por su forma estrellada. Se encuentran generalmente en relación con las paredes vasculares, aunque también se pueden encontrar libres en el estroma coroideo (Fig. 77B). Aunque no hemos podido observar la existencia de conexiones entre melanocitos próximos, por su disposición parece que constituyen una red tridimensional (Fig. 77A).

Las fibras nerviosas coroideas NF-200(+), tanto peri como intervasculares, se encuentran muy próximas a estos melanocitos, pareciendo en ocasiones que van a realizar contacto con ellos. Sin embargo, nuestros estudios con microscopía óptica no nos permiten asegurar la existencia de estos contactos entre fibras nerviosas y melanocitos (Fig. 77A,B,C).

Los resultados de las observaciones a microscopía óptica se encuentran representados de forma esquemática en las Fig. 78,79,80,81,82; en las cuales se ha realizado una reconstrucción tridimensional de la disposición de las fibras nerviosas en las diferentes zonas coroideas. Por último, en la Fig. 83 se ha integrado en una tabla esquemática la diferente intensidad de la inmunorreactividad frente a los distintos anticuerpos empleados en este estudio.

4.- RESULTADOS: FIGURAS

Fig. 1.- Fibra mielínica coroidea (→). En su porción final se pueden observar los núcleos de las células de Schwann (▲). [Montaje plano coroideo; técnica para neurofibrillas de Cajal; 200x].

Fig. 2.- Micrografía en la que se observa la inervación vascular coroidea. [vasos sanguíneos (★); montaje plano coroideo; modificación de Liss al carbonato de plata de Del Río Hortega; 100x].

Fig. 3.- Imagen de vasos coroides de gran tamaño (★) en los que podemos apreciar, tanto las fibras nerviosas perivasculares (→) como intervasculares (▲). [Montaje plano coroideo; modificación de Liss al carbonato de plata de Del Río Hortega; 200x].

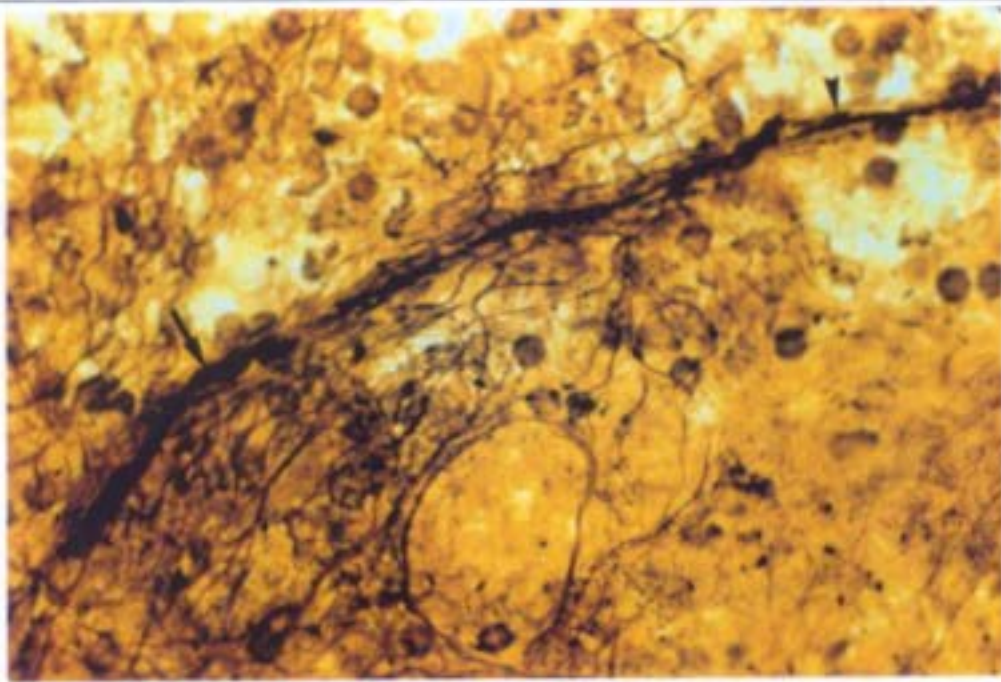


FIG.

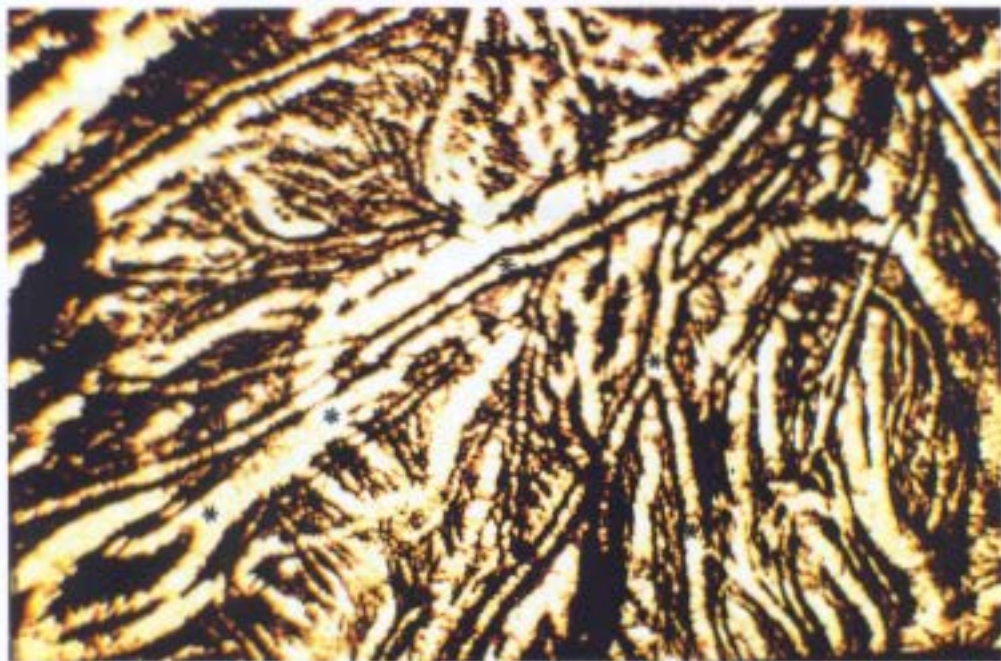


FIG.



FIG.

Fig. 4.- Gran vaso coroideo rodeado de fibras perivasculares con una morfología circular (→). [Montaje plano coroideo; modificación de Liss al carbonato de plata de Del Río Hortega; 400x].

Fig. 5.- Fibras en abanico (→) que nacen en las paredes laterales de un vaso coroideo de gran tamaño. También se observan fibras longitudinales en un plano más profundo (▲). [Montaje plano coroideo; modificación de Liss al carbonato de plata de Del Río Hortega; 1000x].

Fig. 6.- Fibras longitudinales (▲) que se observan recorriendo la superficie de un gran vaso coroideo. Asimismo se aprecian las fibras en abanico en un plano más superficial (→). [Montaje plano coroideo; modificación de Liss al carbonato de plata de Del Río Hortega; 1000x].

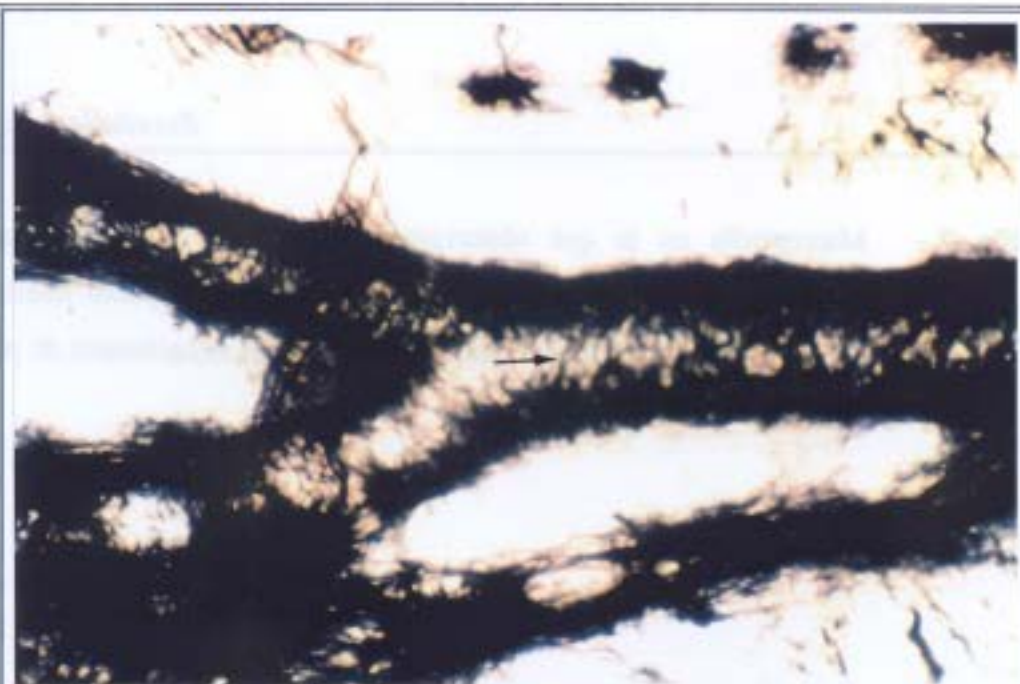


FIG. 4

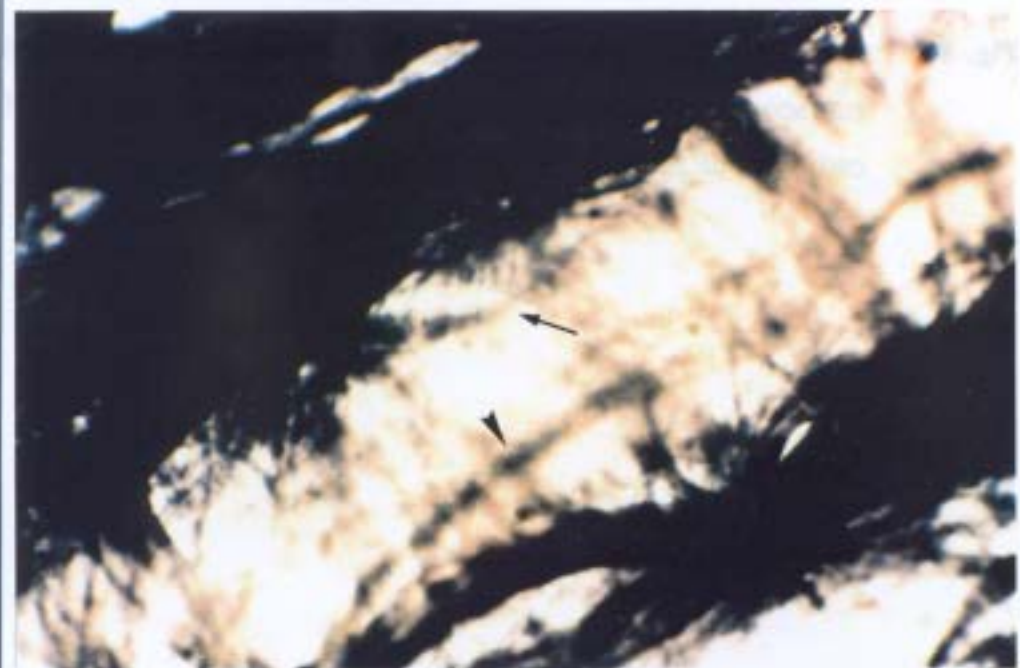


FIG. 5

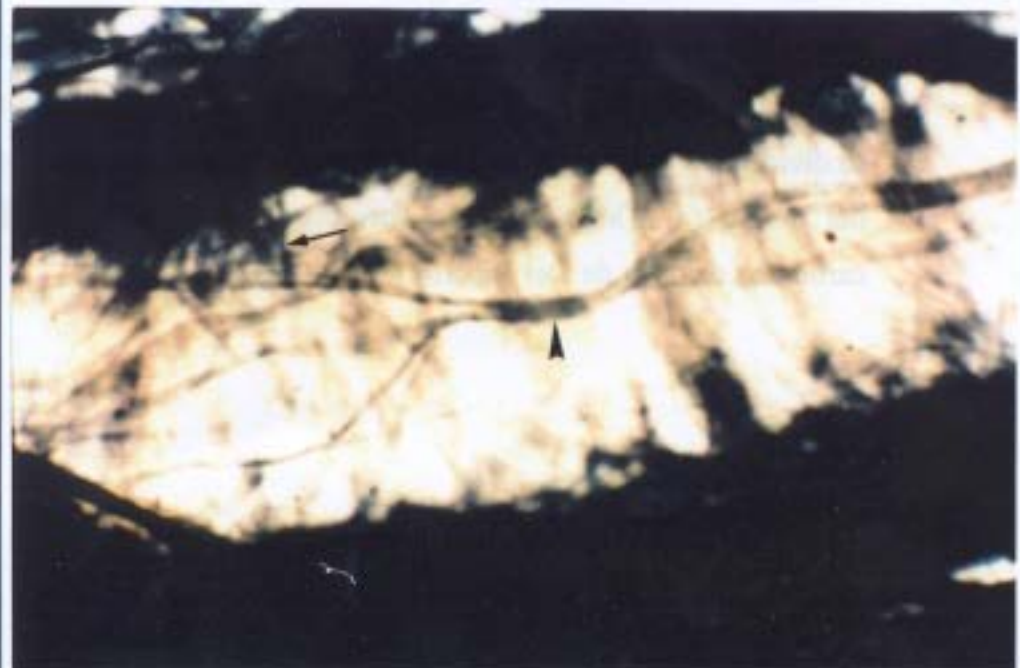


FIG. 6

Fig. 7.- Micrografía en la que observamos fibras nerviosas intervasculares constituyendo dos plexos: el plexo medio (→) y el plexo interno (▲). [Montaje plano coroideo; modificación de Liss al carbonato de plata de Del Río Hortega; 400x].

Fig. 8.- Plexo externo de fibras nerviosas coroideas intervasculares, situado en la supracoroides. [Montaje plano coroideo; modificación de Liss al carbonato de plata de Del Río Hortega; 400x].

Fig. 9.- Fibras intervasculares con morfología lanceolada o en llama (→), situadas entre dos vasos próximos de calibre grueso (★). Al aproximarse al vaso se dividen en otras más finas que llegan a contactar con la pared externa del mismo (▲). [Montaje plano coroideo; modificación de Liss al carbonato de plata de Del Río Hortega; 400x].

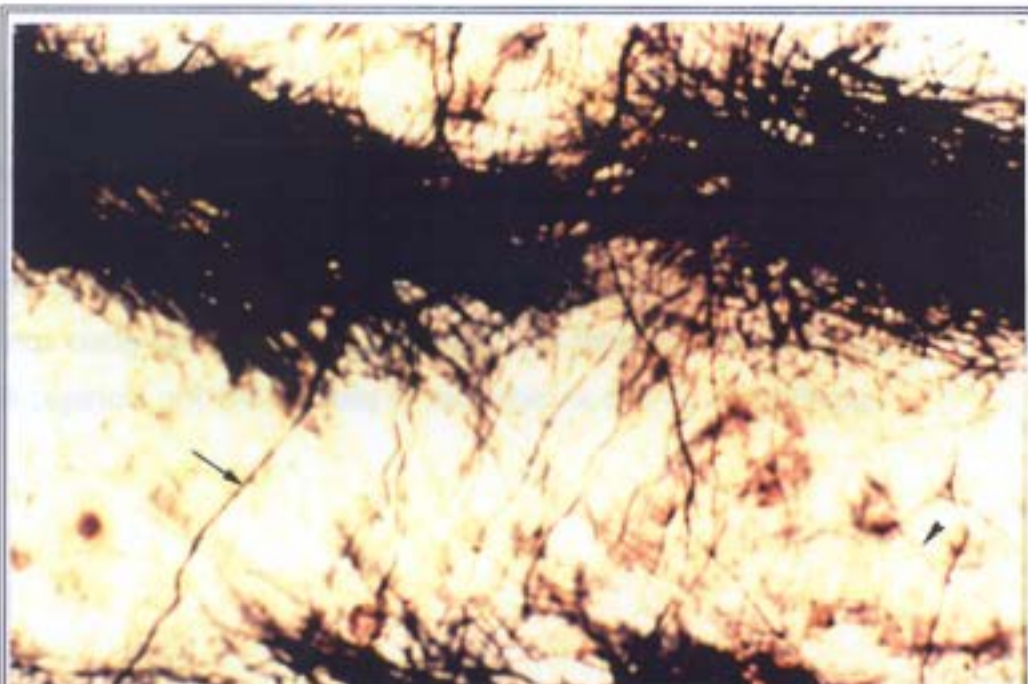


FIG. 7



FIG. 8

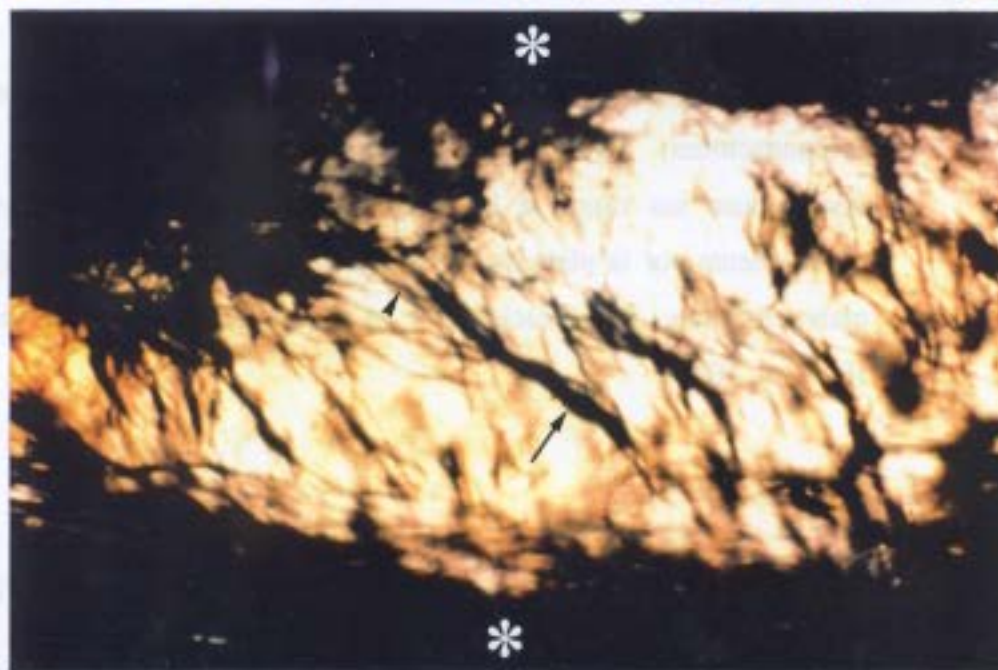


FIG. 9

Fig. 10.- Fibras intervasculares (→) que se proyectan en paralelo y se abren en abanico sobre la pared de un gran vaso (★). [Montaje plano coroideo; modificación de Liss al carbonato de plata de Del Río Hortega; 400x].

Fig. 11.- Fibras intervasculares que presentan una morfología helicoidal o en sacacorchos (→). [Montaje plano coroideo; modificación de Liss al carbonato de plata de Del Río Hortega; 400x].

Fig. 12.- Célula ganglionar coroidea de tipo bipolar (▲). De su soma parten dos prolongaciones, dividiéndose dicotómicamente una de ellas (→), dirigiéndose sus ramas a la pared de un vaso (★). Se reduce tan intensamente por la plata que no permite apreciar su núcleo. [Montaje plano coroideo; modificación de Liss al carbonato de plata de Del Río Hortega; 400x].

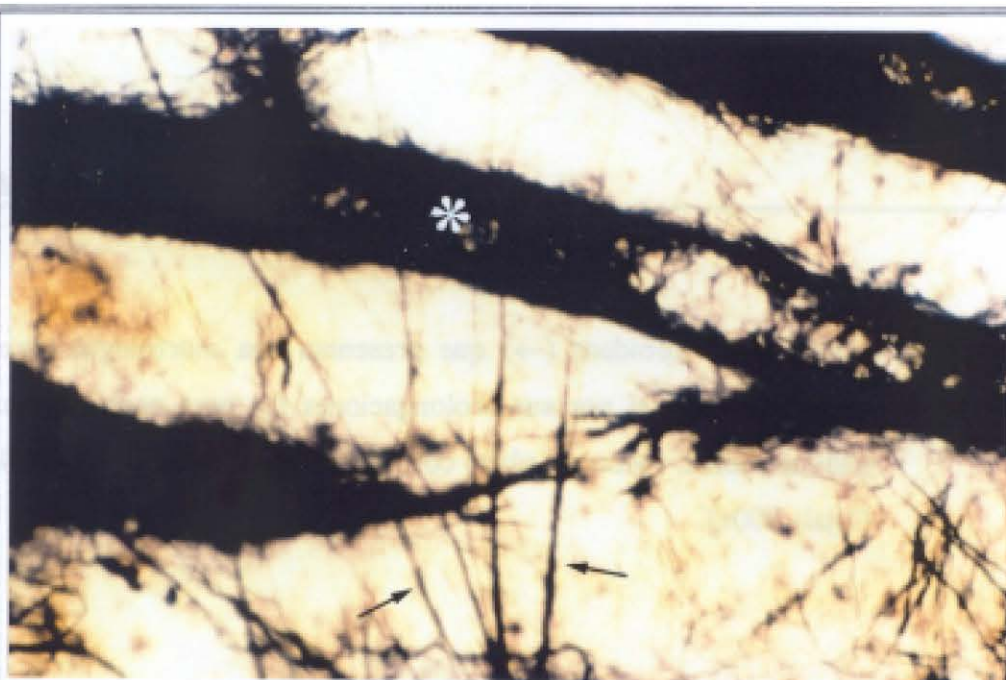


FIG. 10



FIG. 11



FIG. 12

Fig. 13.- Melanocitos coroideos (→) que presentan una morfología estrellada, uniéndose entre sí por sus prolongaciones (▲) para constituir una red tridimensional. [Montaje plano coroideo; técnica para neurofibrillas de Cajal; 200x].

Fig. 14.- Melanocitos coroideos de forma estrellada y diferentes tamaños (→). [Montaje plano coroideo; modificación de Liss al carbonato de plata de Del Río Hortega; 400x].

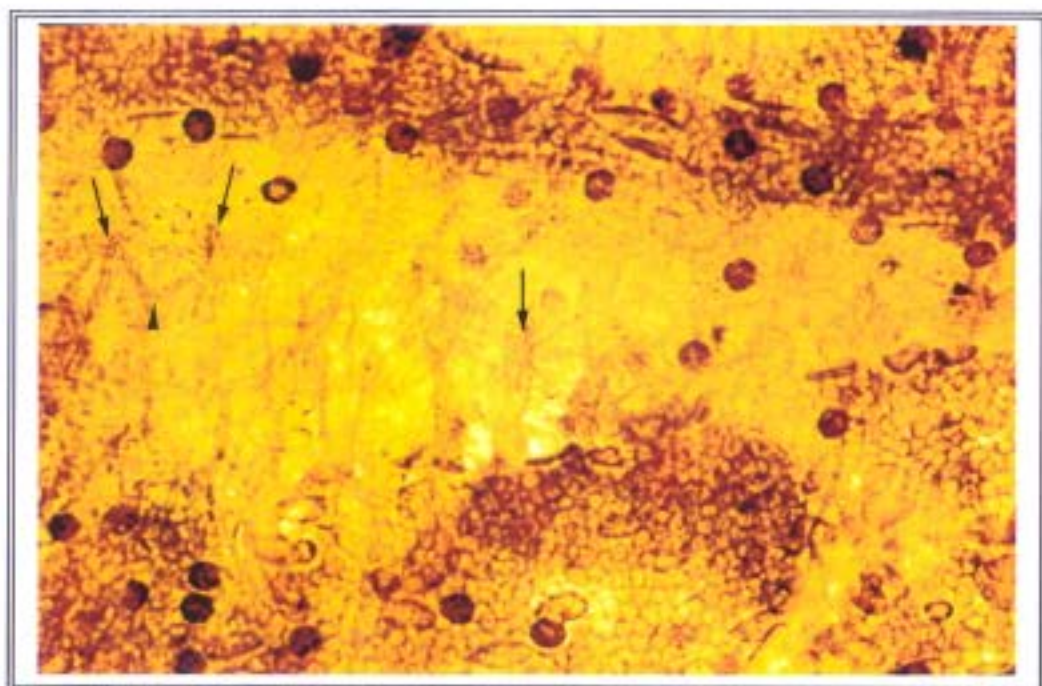


FIG. 13

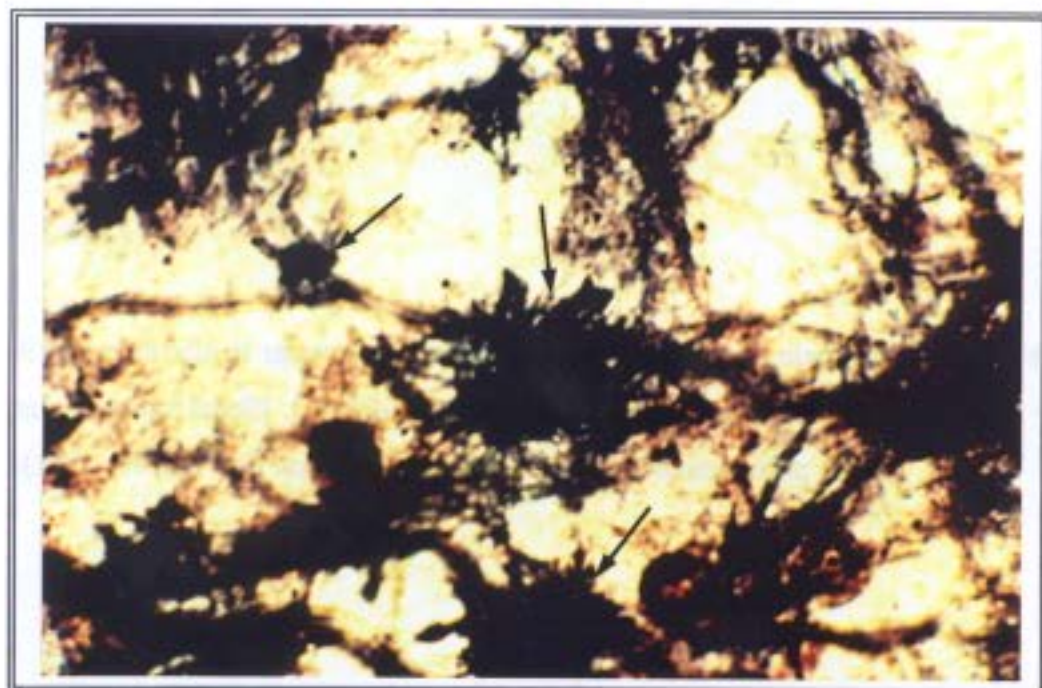


FIG. 14

Fig. 15.- Inmunoreactividad PGFA(+) (→) localizada alrededor de la pared de los grandes vasos coroideos (arteriales y venosos) (★). [Montaje plano coroideo; inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 125x].

Fig. 16.- Micrografía de vasos coroideos de gran tamaño. La señal perivascular PGFA(+) (→) es debida a la presencia de múltiples fibras. [Montaje plano coroideo; inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 250x].

Fig. 17.- Montaje plano coroideo donde se puede apreciar la diferente distribución e intensidad de la inmunoreactividad PGFA(+). [Señal intervascular (→), señal perivascular (▲); inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 100x].

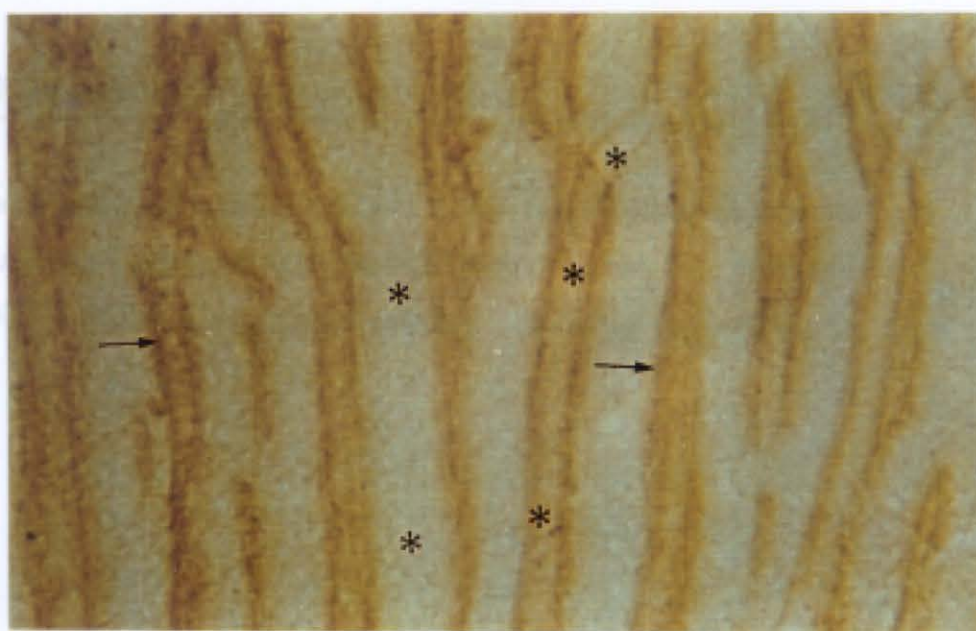


FIG. 15

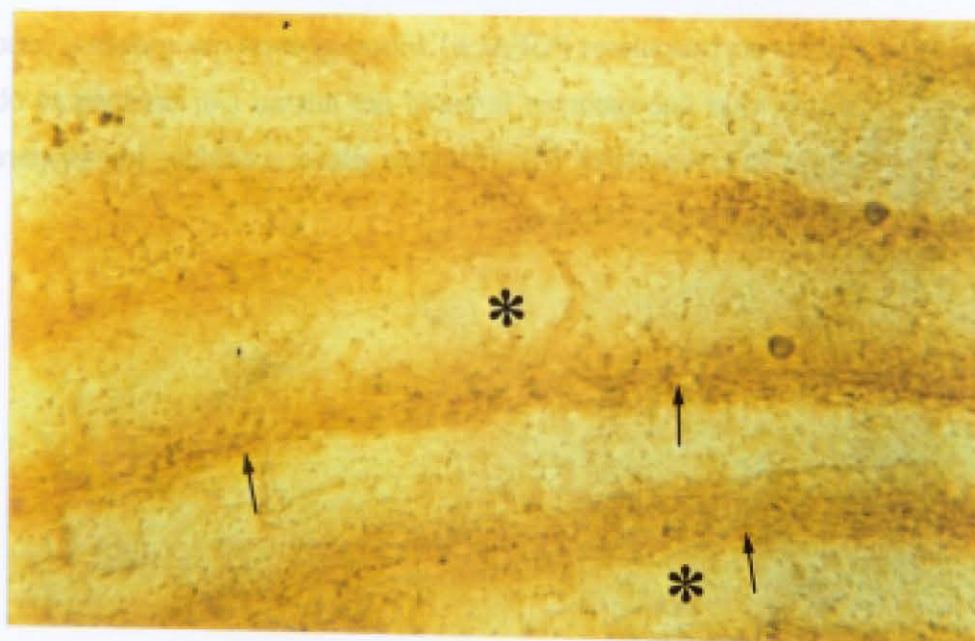


FIG. 16

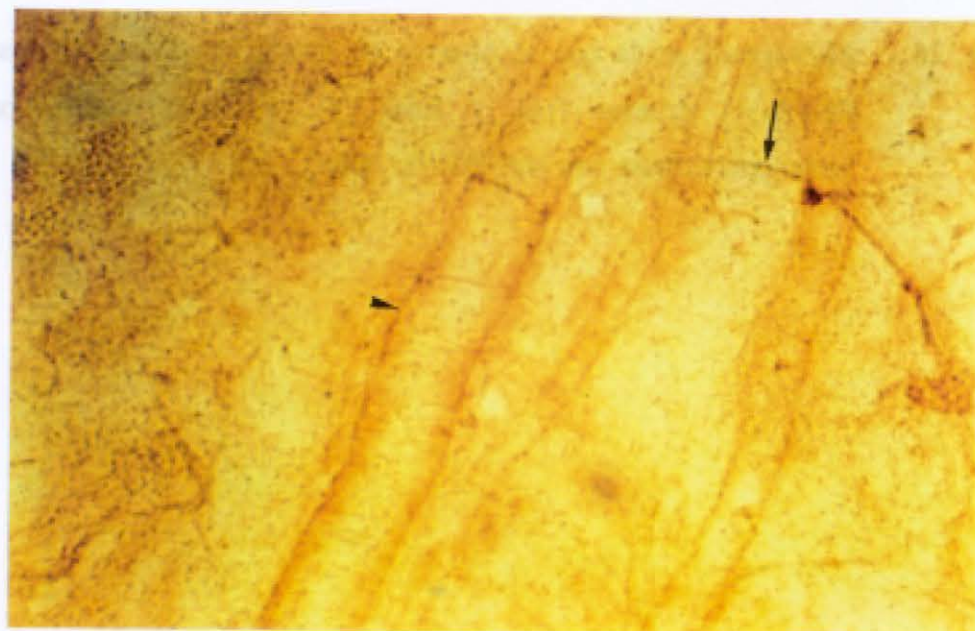


FIG. 17

Fig. 18.- Inmunoreactividad PGFA(+) perivascular en dos grandes vasos coroideos (★) debida a la sumación de señales de fibras nerviosas individuales (▲). [Montaje plano coroideo; inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 250x].

Fig. 19.- Fibras perivasculares PGFA(+). Fibras gruesas que rodean al vaso (→) y fibras finas que recorren la pared del mismo (▲); también se observan fibras intervasculares (↑↑). [Montaje plano coroideo; inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 250x].

Fig. 20.- Micrografía en la que se observa en detalle las fibras perivasculares PGFA(+) gruesas (→) y finas (▲). [Montaje plano coroideo; inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 400x].

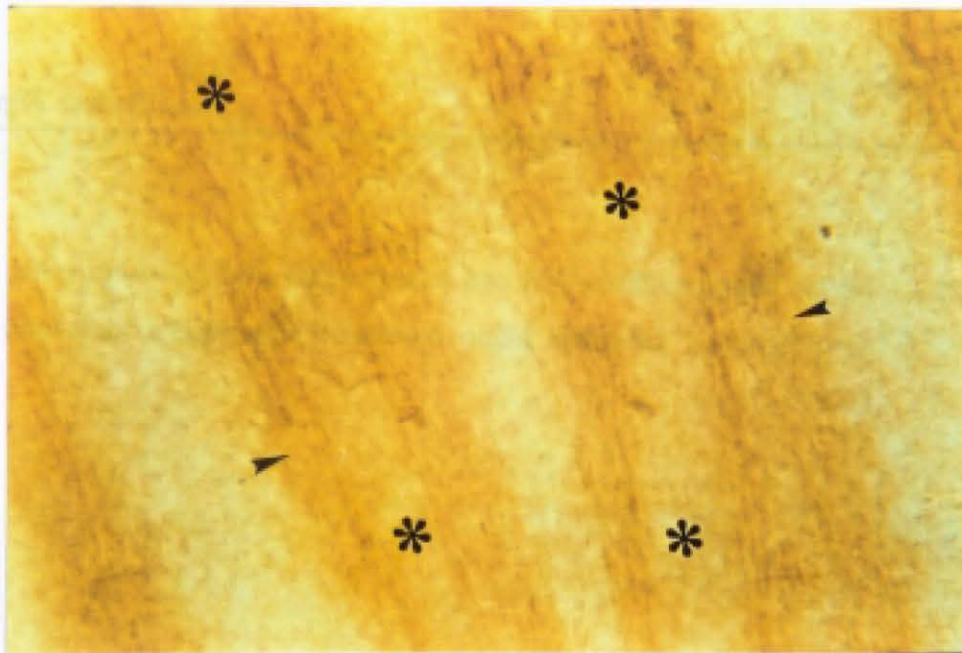


FIG. 18

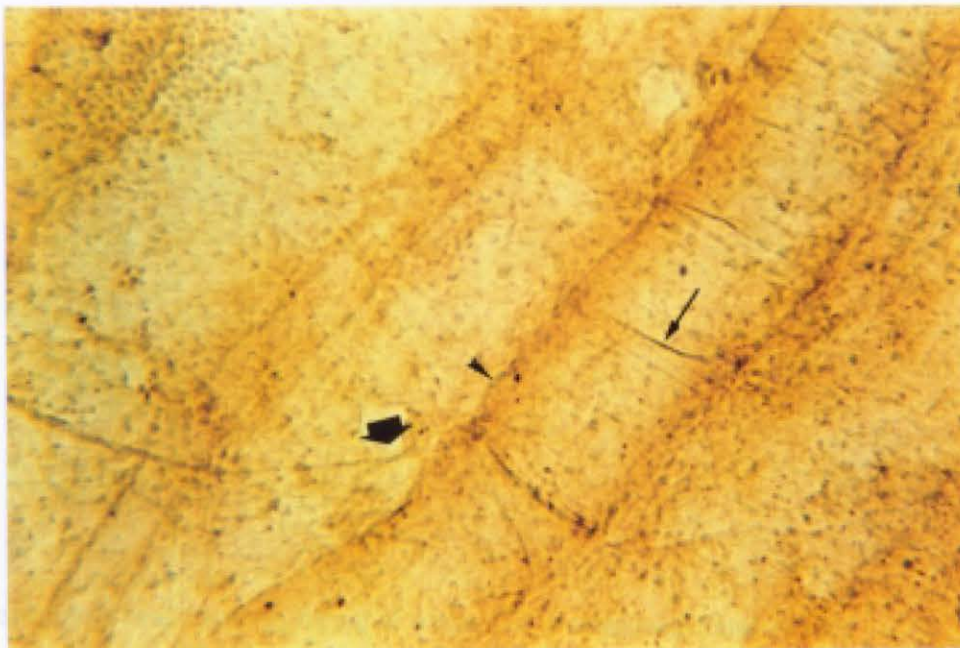


FIG. 19

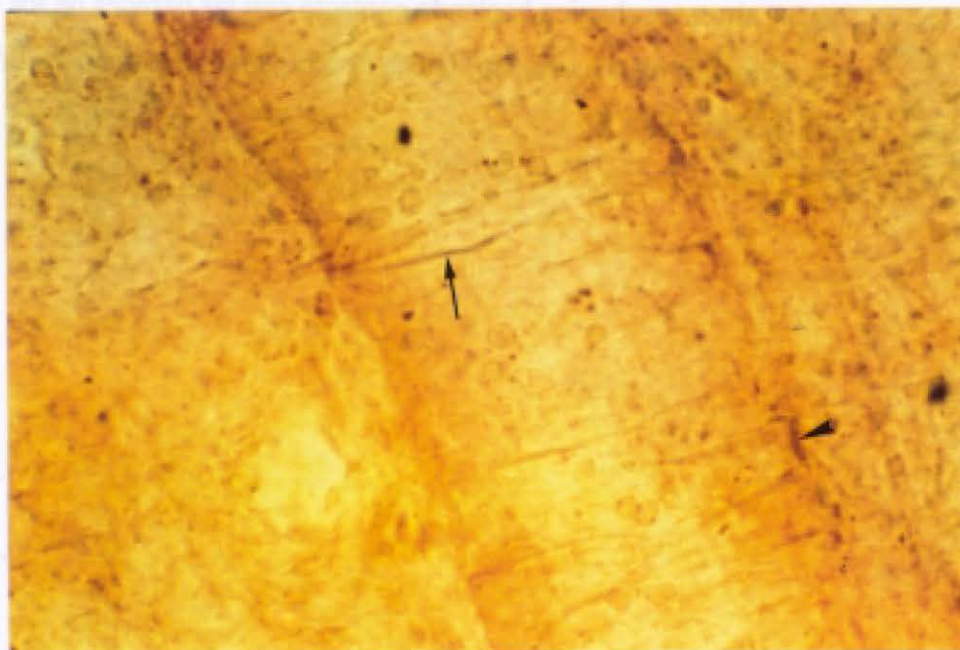


FIG. 20

Fig. 21.- Fibras intervasculares (→) con intensa señal PGFA(+) entre los vasos coroides (★). [Montaje plano coroides; inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 250x].

Fig. 22.- Fibras intervasculares (→), sobre la pared de dos vasos sanguíneos (★), que se abren en abanico haciendo contacto con las paredes de los mismos (▲). [Montaje plano coroides; óptica de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti-PGFA; 250x].

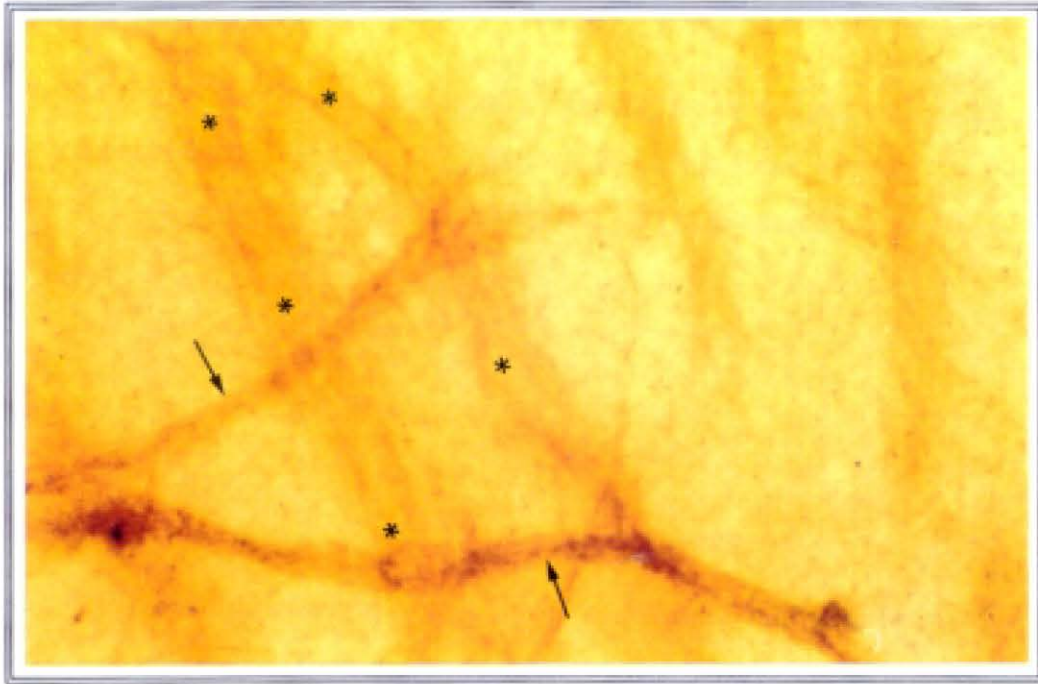


FIG. 21

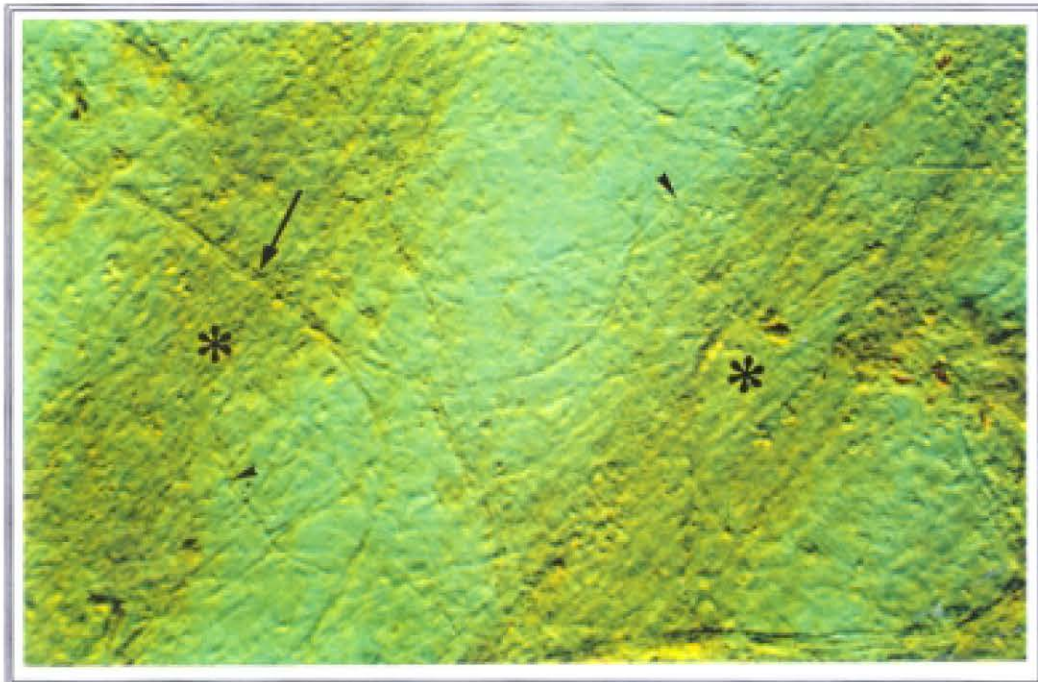


FIG. 22

Fig. 23.- Inmunoreactividad NF-68(+) localizada alrededor de la pared de los grandes vasos coroides arteriales y venosos. [Montaje plano corioideo; inmunoperoxidasa con anti NF-68; 100x].

Fig. 24.- Micrografía realizada a nivel de los procesos ciliares (P) donde se aprecian plexos de fibras NF-68(+) (→). [Montaje plano corioideo; inmunoperoxidasa con anti NF-68; 250x].

Fig. 25.- Fibras intervasculares NF-68(+) de largo recorrido (→), se observa su apariencia discontinua y su intensa señal NF-68(+). [Montaje plano corioideo; inmunoperoxidasa con anti NF-68; 125x].

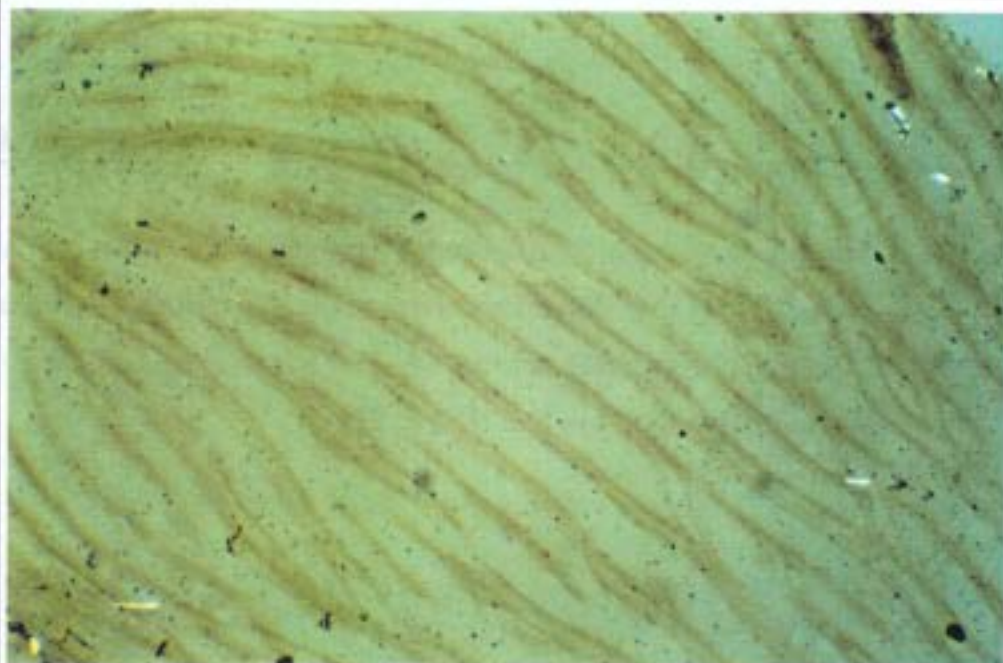


FIG. 23

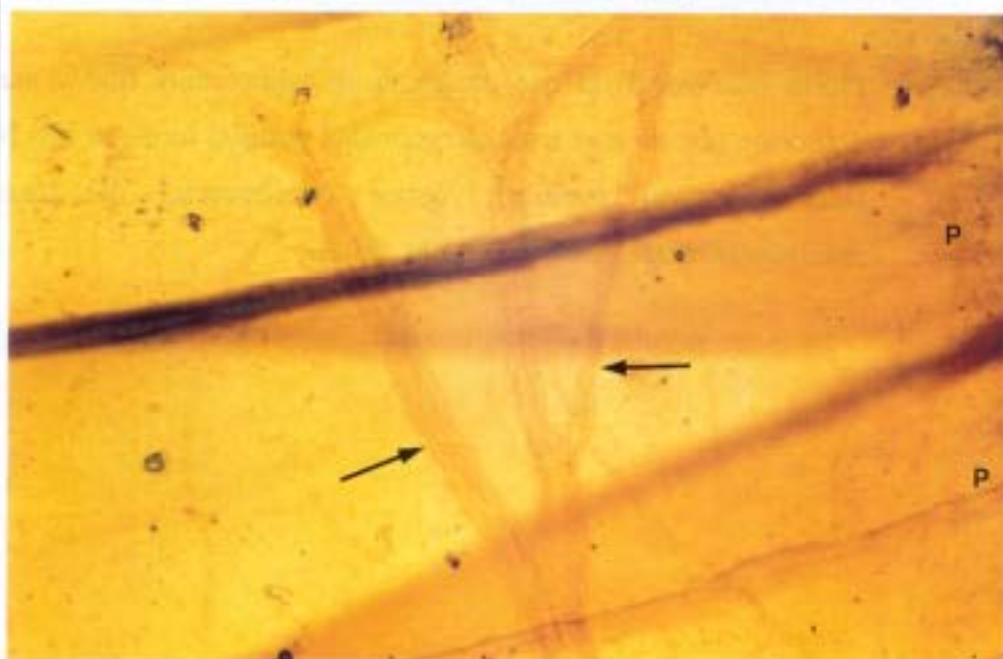


FIG. 24



FIG. 25

Fig. 26.- Montaje plano de coroides donde podemos observar la señal perivascular NF-68(+) (▲) rodeando a los vasos coroides de mediano y gran tamaño (★). También podemos apreciar la señal intervascular NF-68(+) (→). [Inmunoperoxidasa con anti NF-68; 32x].

Fig. 27.- Fibras intervasculares que presentan un calibre muy fino y una gran definición por su gran inmunoreactividad positiva frente al anti NF-68. [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-68; 400x].

Fig. 28.- Detalle de las fibras intervasculares en el que podemos apreciar su naturaleza doble, siendo una de las ramas más fina (→) que la otra (▲). [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-68; 400x].

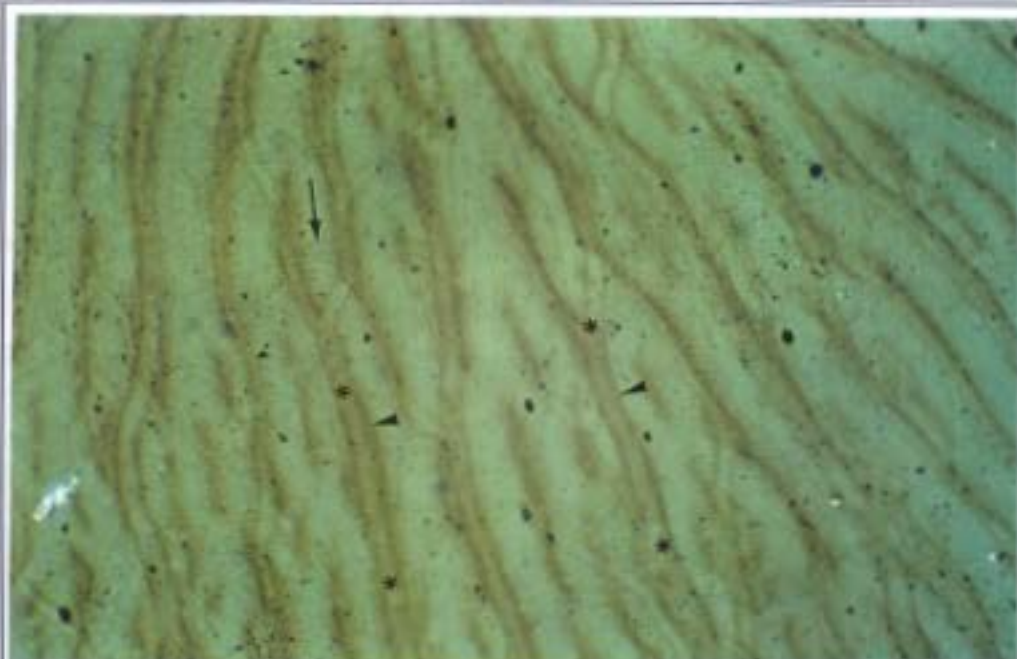


FIG. 26



FIG. 27



FIG. 28

Fig. 29.- Fibras intervasculares que hacen contacto con las paredes de un gran vaso (★) sin adoptar una configuración especial. [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-68; 400x].

Fig. 30.- Micrografía a nivel del cuerpo ciliar en la que se aprecia un fascículo nervioso grueso NF-68(+) de forma acintada (▲) que recorre circunferencialmente el mismo. [Montaje plano coroideo; inmunoperoxidasa con anti NF-68; 32x].

Fig. 31.- Detalle del fascículo nervioso del cuerpo ciliar (▲) que presenta una señal NF-68 fuertemente positiva, y está formado por la reunión de múltiples fibras de calibre fino. [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-68; 250x].

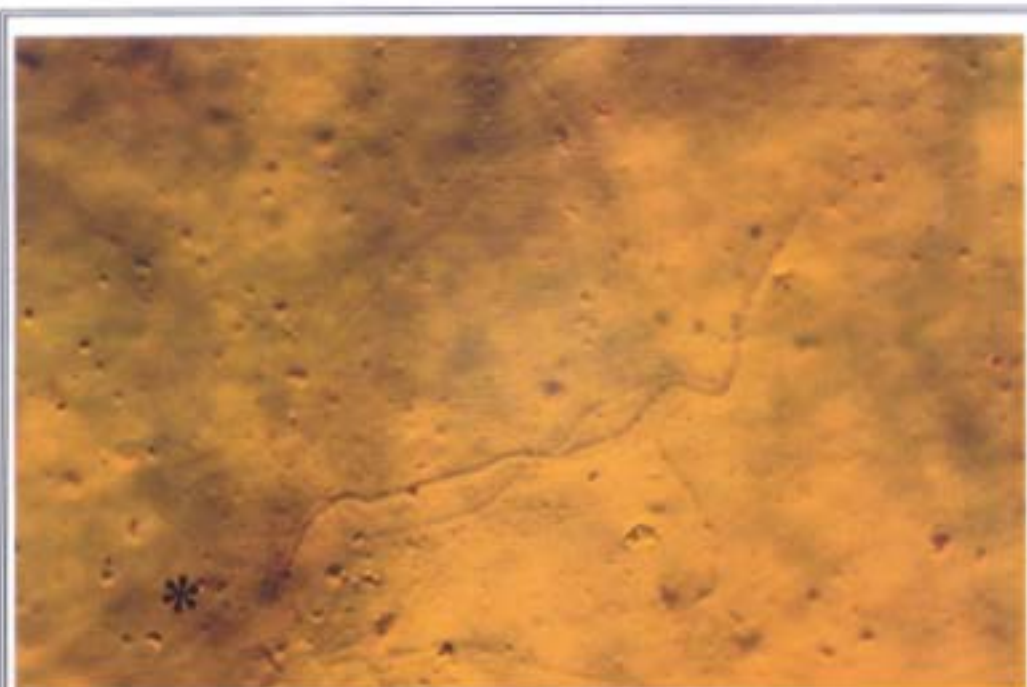


FIG. 29

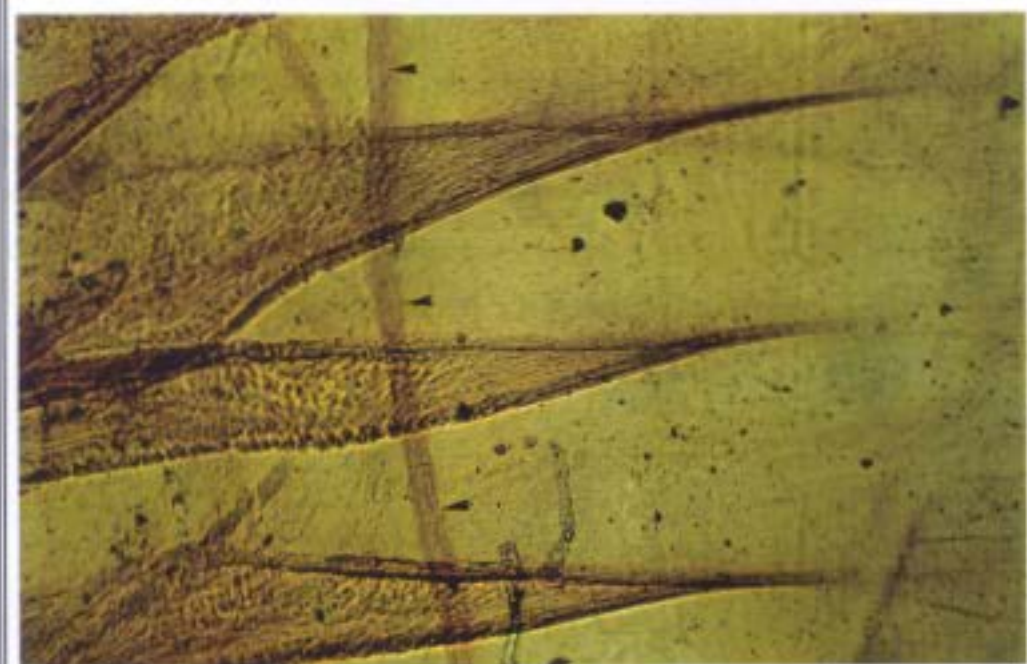


FIG. 30

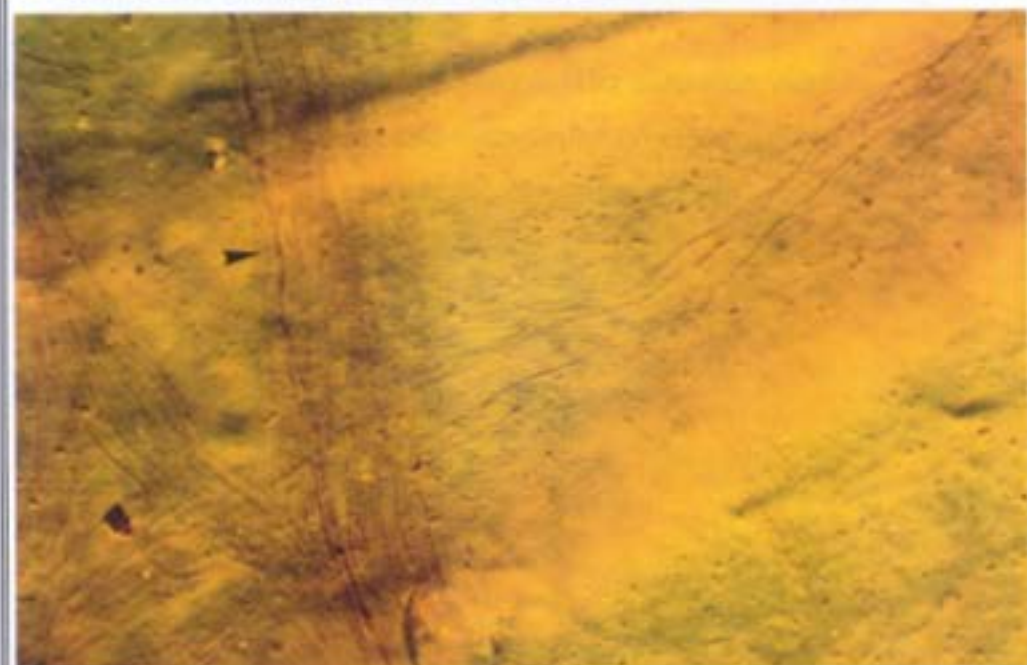


FIG. 31

Fig. 32.- Nervio ciliar largo, constituido por un gran número de fibras nerviosas de calibre muy fino. [Montaje plano coroideo; inmunoperoxidasa con anti NF-68; 400x].

Fig. 33.- Micrografía realizada a nivel de la zona de transición cilio-coroidea, en la que se aprecia un fascículo de fibras (↑) que se ramifica dando varias ramas, unas que se introducen en el territorio ciliar (▲), y otras que lo hacen dentro del territorio coroideo (→). [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-68; 250x].

Fig. 34.- Fibras nerviosas cilio coroideas (▲) que giran para regresar hacia el territorio ciliar (c) adquiriendo una trayectoria en forma de v. [Montaje plano coroideo; inmunoperoxidasa con anti NF-68; 125x].

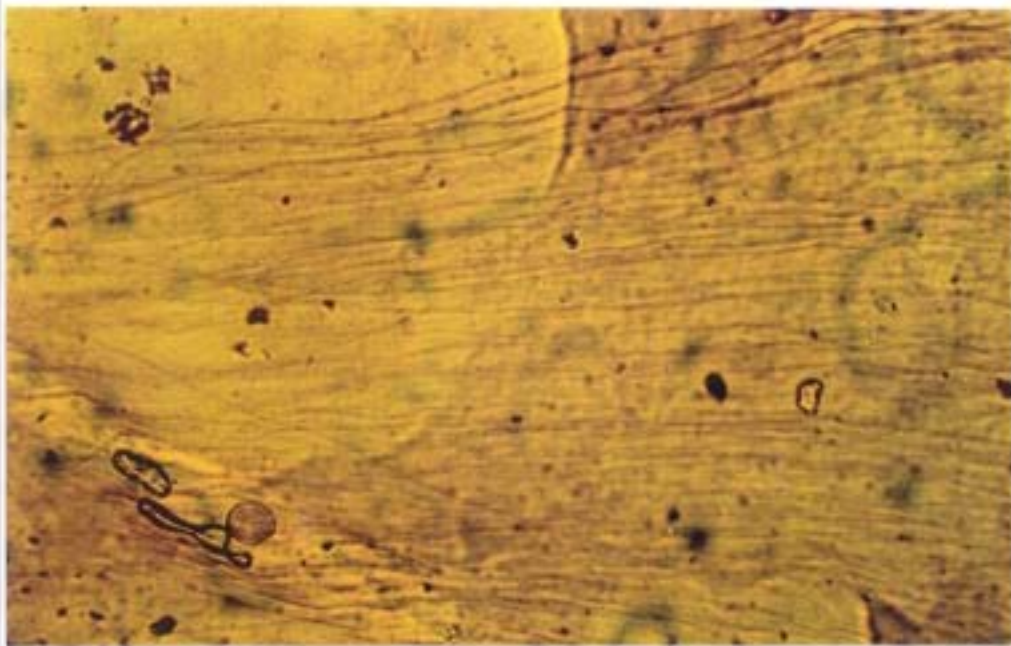


FIG. 32

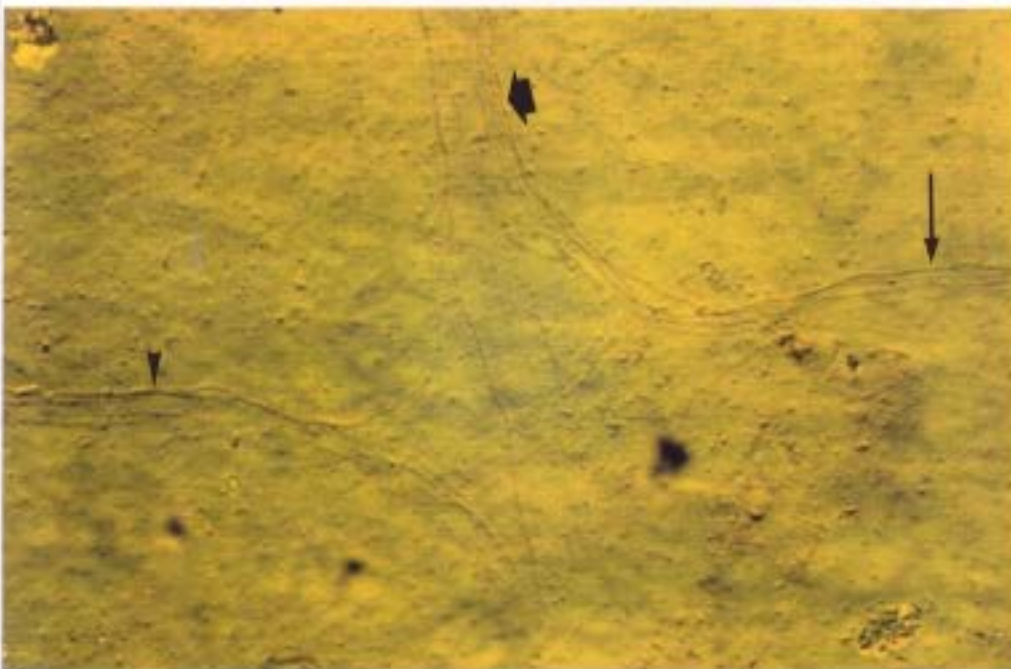


FIG. 33

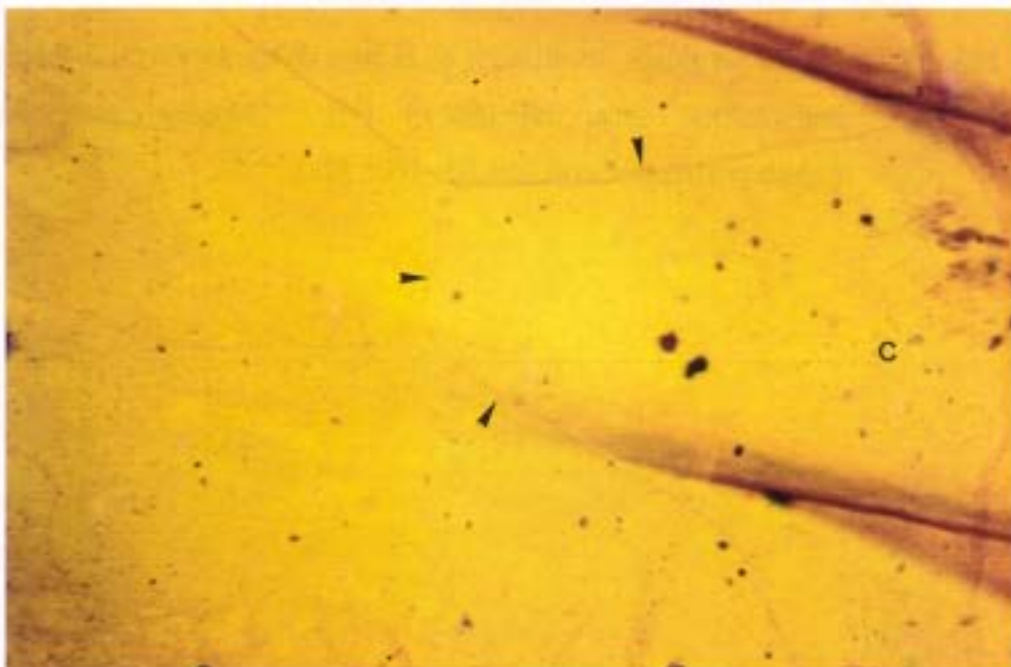


FIG. 34

Fig. 35.- Inmunoreactividad NF-160(+) alrededor de los vasos coroideos arteriales y venosos. [Montaje plano coroideo; inmunoperoxidasa con anti NF-160; 32x].

Fig. 36.- Micrografia coroidea en la que se observa como la señal perivascular (→) y la intervascular (▲) presentan una intensidad notable y muy similar. [Montaje plano coroideo; inmunoperoxidasa con anti NF-160; 125x].

Fig. 37.- Plexos nerviosos, localizados en la zona de transición cilio-coroidea, con una intensa señal NF-160(+) (▲). [Montaje plano coroideo; inmunoperoxidasa con anti NF-160; 32x].

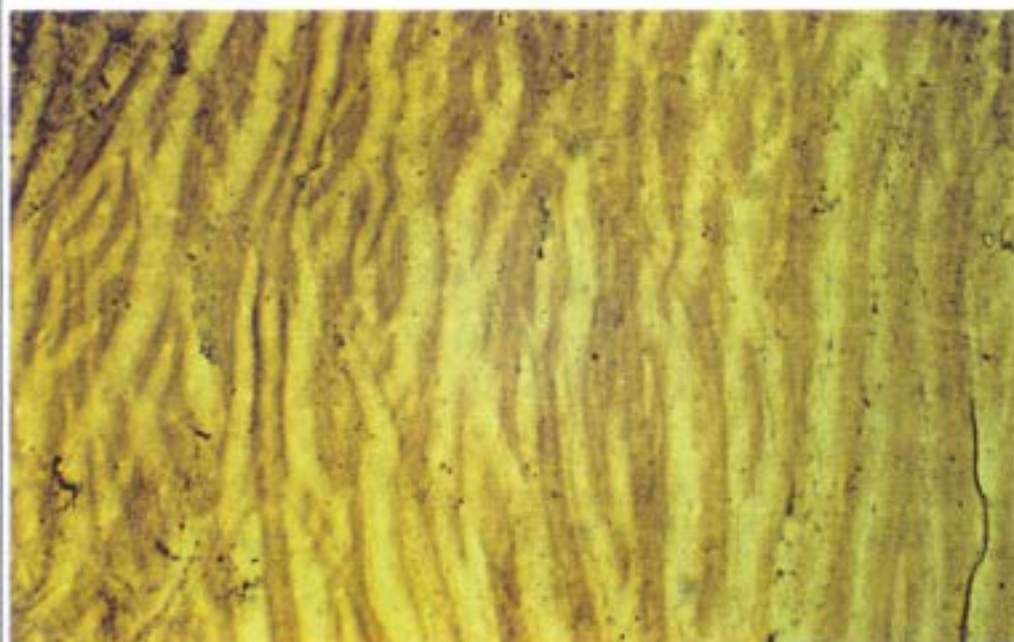


FIG. 35



FIG. 36

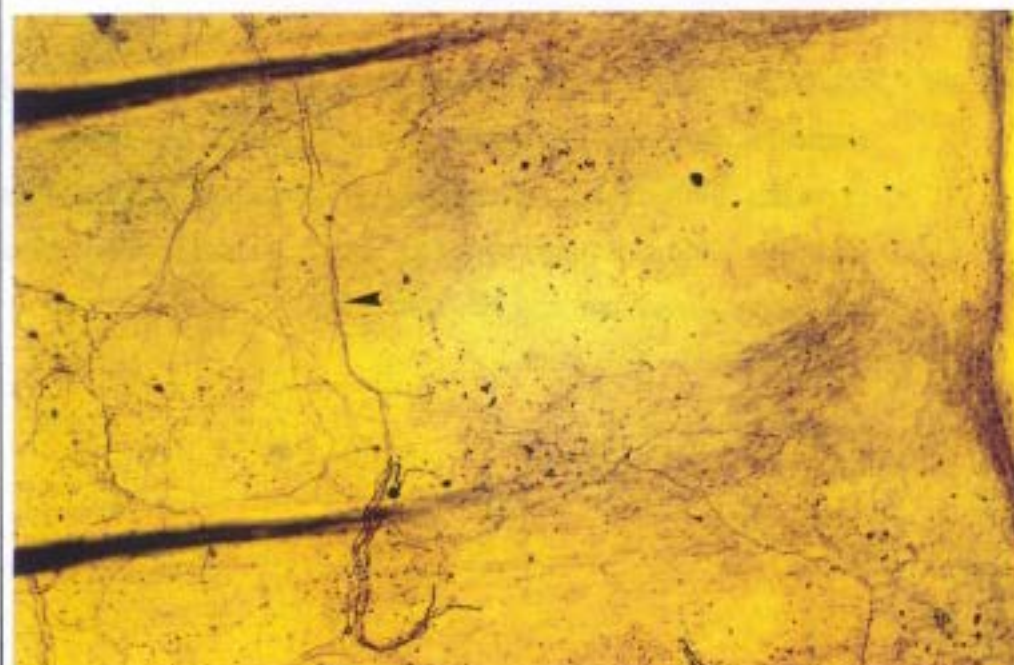


FIG. 37

Fig. 38.- Detalle de los plexos ciliares (▲) a nivel de un proceso ciliar (P). [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-160; 400x].

Fig. 39.- Vasos coroideos de mediano calibre (★) rodeados de fascículos nerviosos acintados (▲). También se pueden observar las fibras intervasculares (→). [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-160; 250x].

Fig. 40.- Imagen de un gran vaso coroideo en el que podemos apreciar que los fascículos nerviosos acintados están constituidos por múltiples fibras nerviosas individuales (▲) que se agrupan entre sí para formar el fascículo. [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-160; 400x].

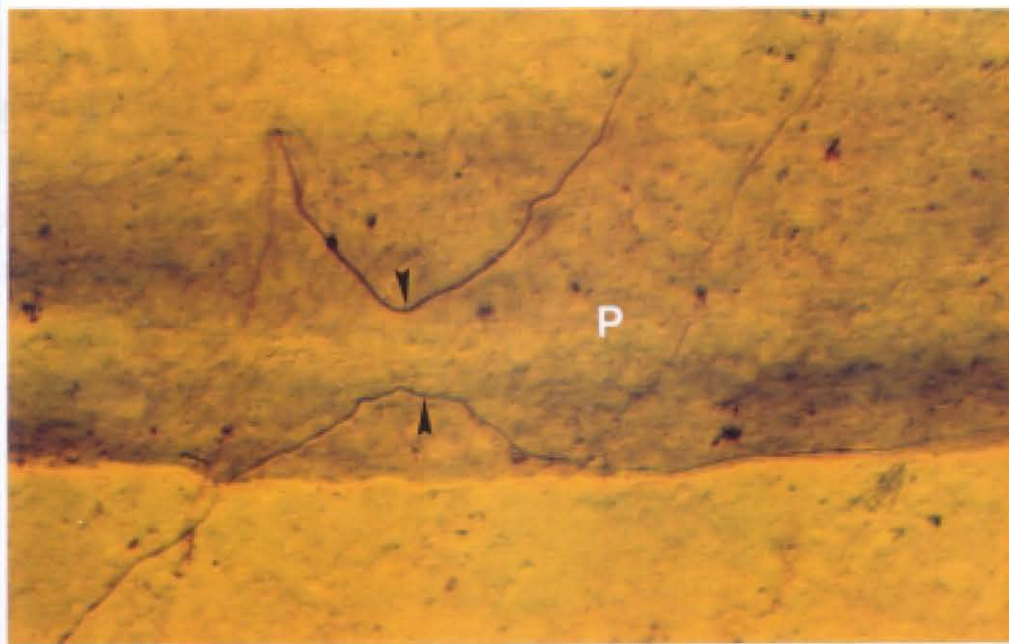


FIG. 38



FIG. 39

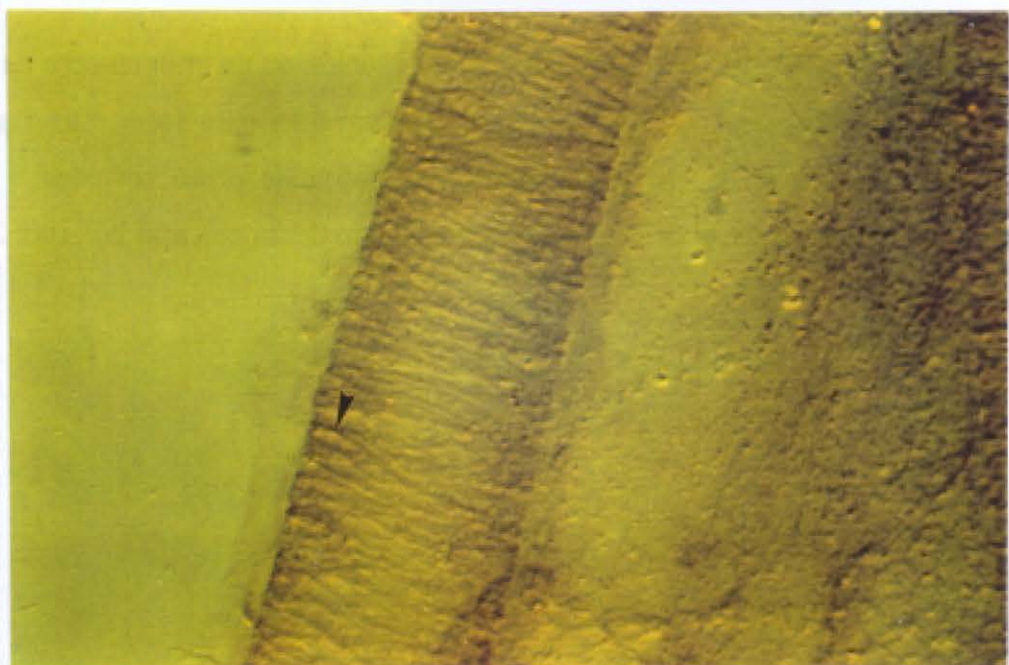


FIG. 40

Fig. 41.- Señal NF-160(+) (→) intensa, rodeando a los vasos coroideos de mediano y gran calibre (★), reproduciendo el árbol vascular coroideo. [Montaje plano coroideo; inmunoperoxidasa con anti NF-160; 250x].

Fig. 42.- Detalle de la pared de un gran vaso coroideo en el que se puede apreciar fibrillas (▲) con forma de diapasón. [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-160; 400x].

Fig. 43.- Nervio ciliar largo formado por la reunión de un gran número de fibras fuertemente NF-160(+) (▲) que se agrupan para formar un fascículo nervioso de apariencia aplanada. [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-160; 250x].

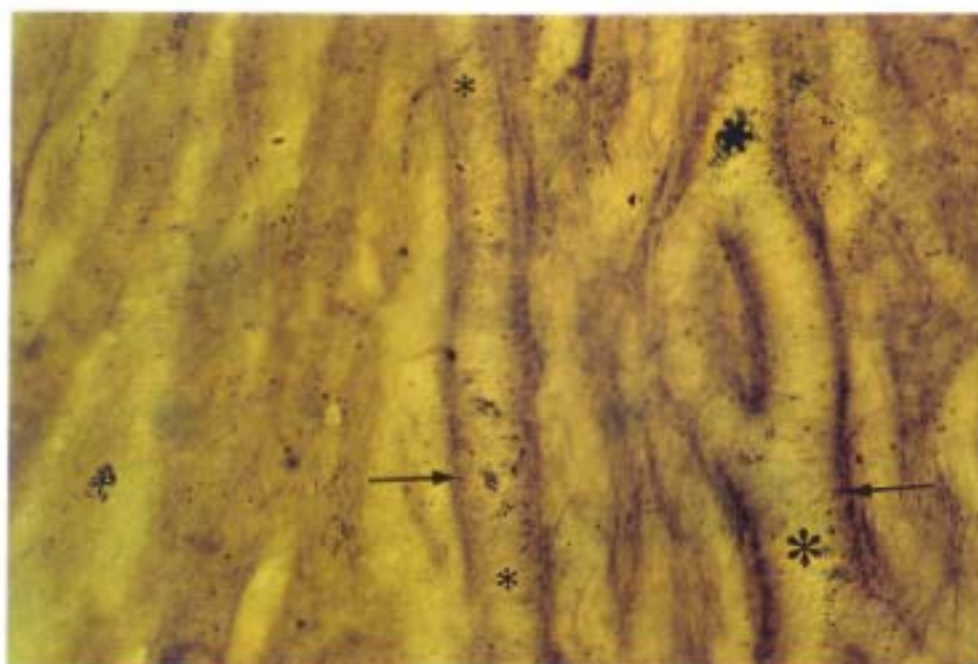


FIG. 41

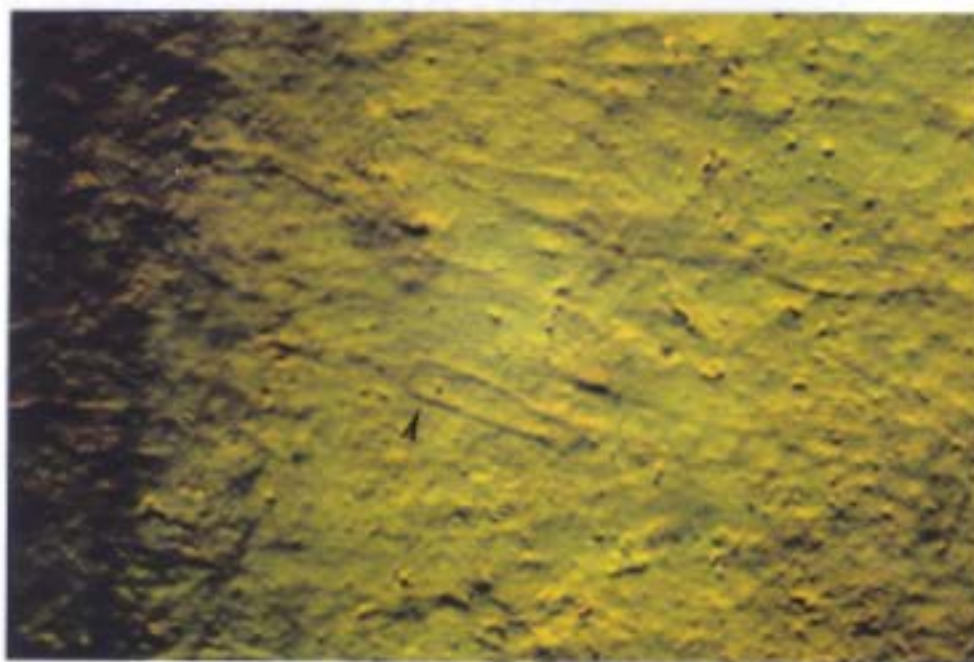


FIG. 42

FIG. 43

Fig. 44 (A,B,C).- Fascículos nerviosos NF-160(+) constituidos por un número aproximado de 10-20 fibras. [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-160; (A, B): 250x; (C): 400x].

(A).- Fascículo constituido por fibras con una señal NF-160 intensamente positiva (++++)(▲), que se ramifica desde su superficie en otro de menor grosor (→).

(B).- Fascículo (▲) que se ramifica a partir de fibras, tanto de su superficie como de su parte interna (→).

(C).- Detalle de estos fascículos donde apreciamos las varicosidades gruesas o ensanchamientos (→) que presentan en alguna ocasión, con una intensa inmunoreacción NF-160(+).

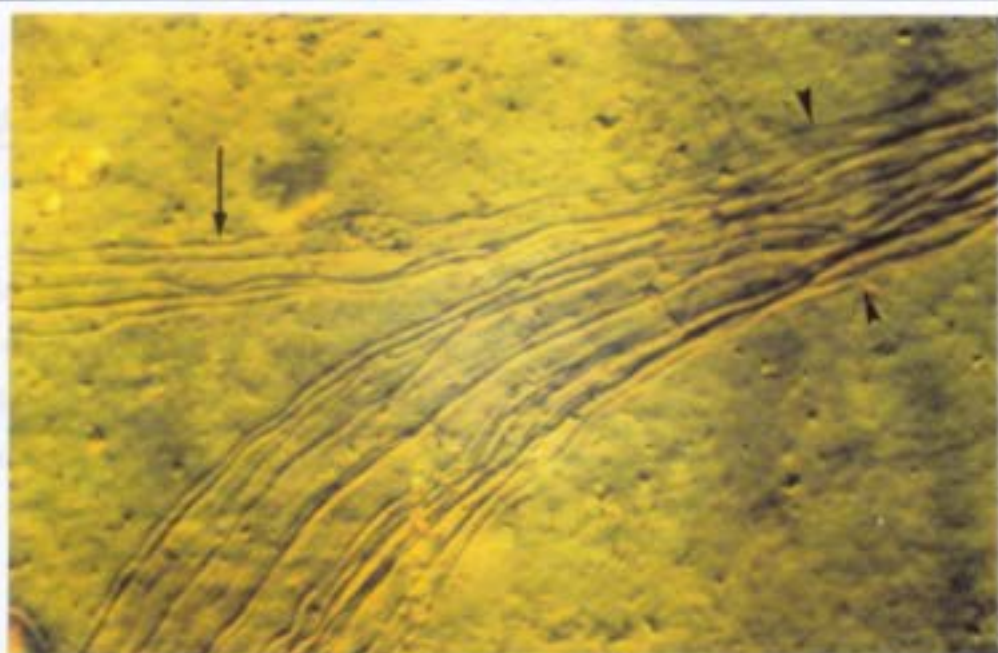


FIG. 44 A

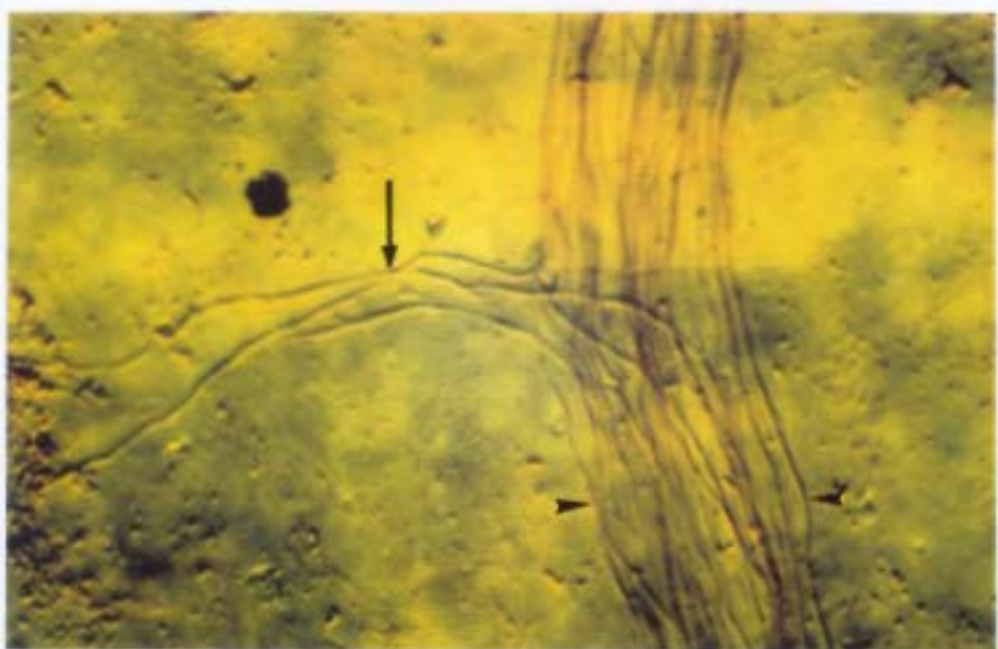


FIG. 44 B

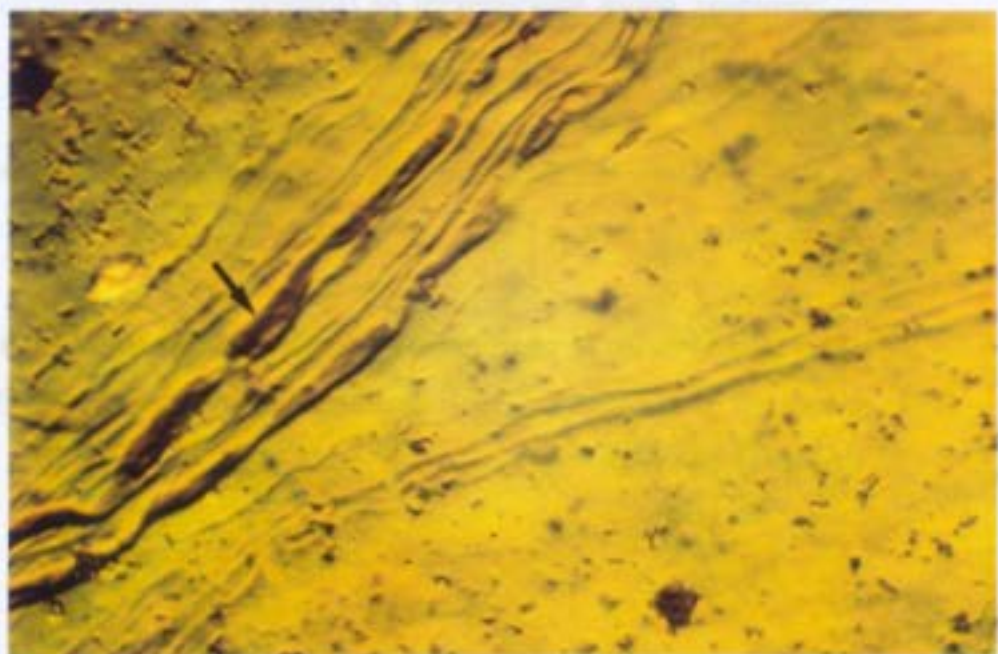


FIG. 44 C

Fig. 45.- Fascículo nervioso (→) situado paralelo a la superficie de un gran vaso (★) constituyendo el sistema pararterial. También se observan las fibras en forma de diapasón (▲) en la pared externa del gran vaso. [Montaje plano corioideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-160; 250x].

Fig. 46(A,B) Fibras intervasculares coroides NF-160(+). [Montaje plano corioideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-160; (A): 250x; (B): 400x].

(A).- Fibras intervasculares con una reactividad frente al anti NF-160 extremadamente intensa (→).

(B).- Detalle de los hinchamientos periódicos que presentan estas fibras a lo largo de su recorrido, apreciándose asimismo como parten fibrillas de los mismos (→).

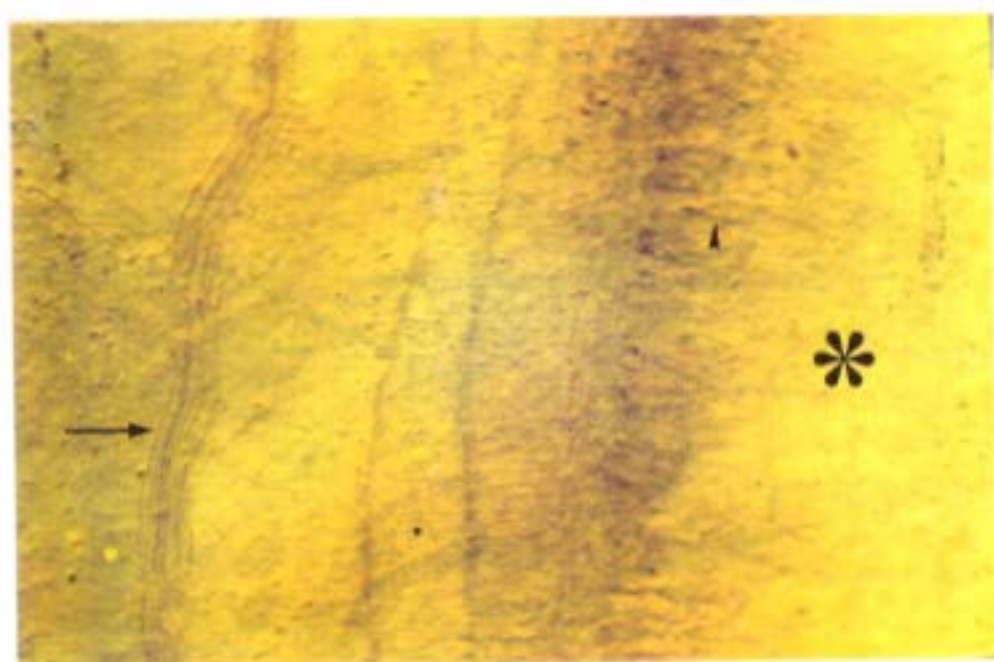
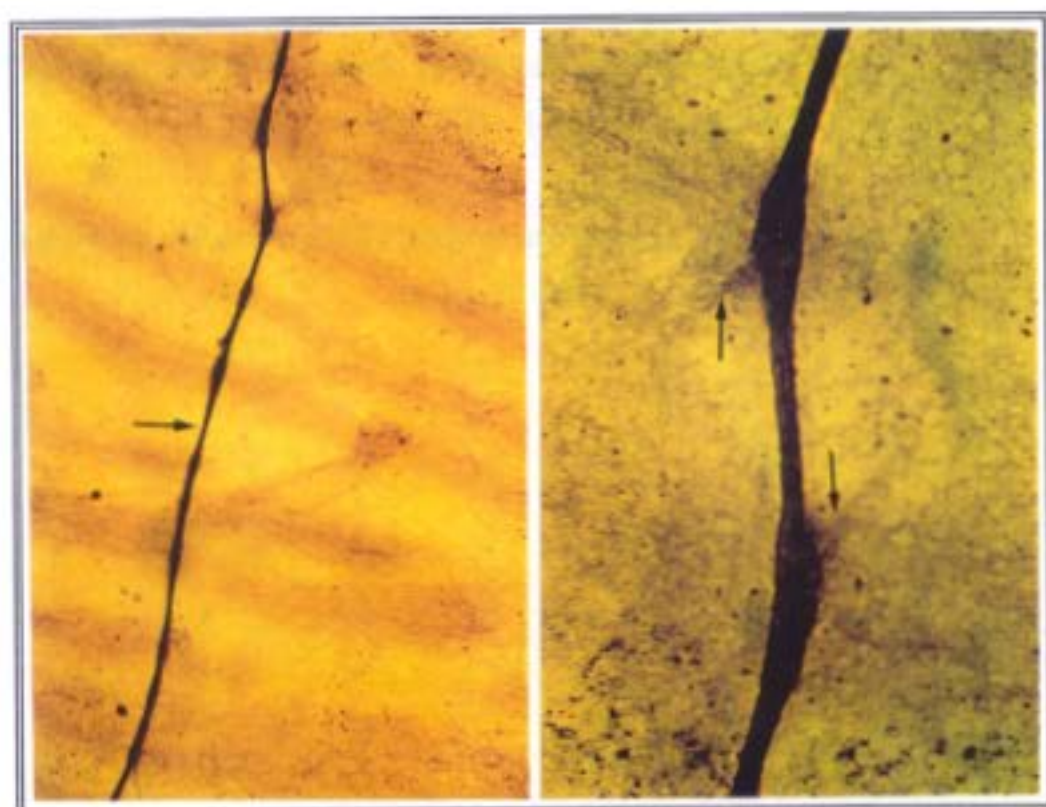


FIG. 45



A

B

FIG. 46

Fig. 47.- Plexos nerviosos NF-160(+) (→) en la zona de transición cilio-coroidea. Se observan dos células ganglionares (▲) formando parte de ellos. [(P): proceso ciliar; ontaje plano corioideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-160; 250x].

Fig. 48(A,B) Fibras intervasculares de largo recorrido NF-160(+). [Montaje plano corioideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-160; 250x].

(A).- Fibra con engrosamientos a modo de varicosidades (→) formada por varios filamentos (↑). También se observa la presencia de las fibras perivasculares acintadas (▲). [(★): vaso sanguíneo].

(B).- Fibra que presenta una naturaleza triple, estando constituida por un filamento grueso (▲) y dos finos (→).



FIG. 47

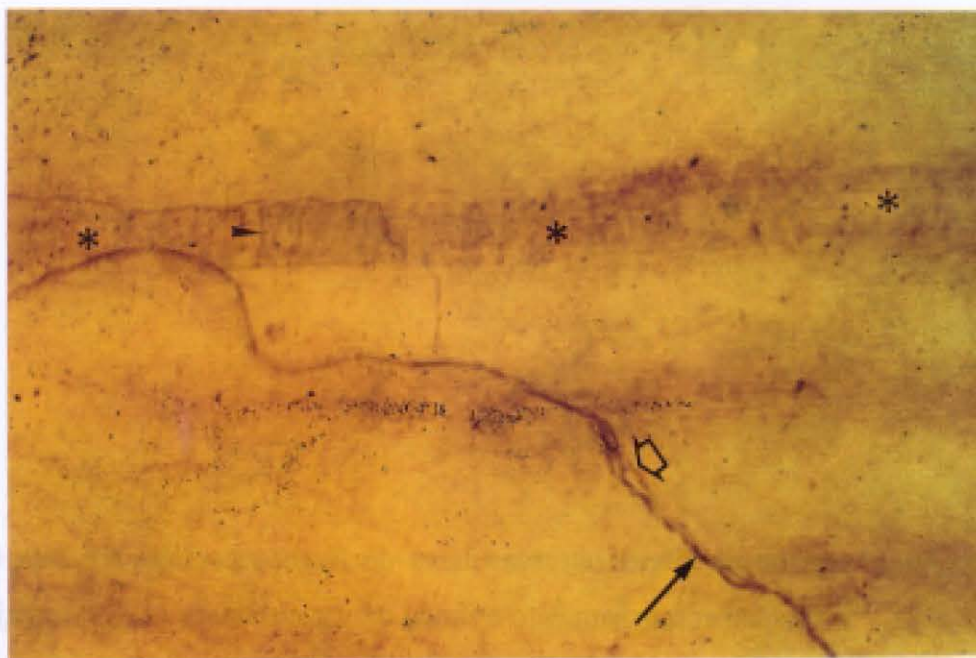


FIG. 48 A



FIG. 48 B

Fig. 49.- Fibras intervasculares NF-160(+) de largo recorrido, constituidas por la unión de varias fibras : unas de calibre grueso (▲) y otras de calibre fino (→). [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-160; 250x].

Fig. 50.- Detalle de fibras intervasculares de largo recorrido NF-160(+), que presentan ensanchamiento a modo de varicosidades (▲). [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-160(+); 400x].

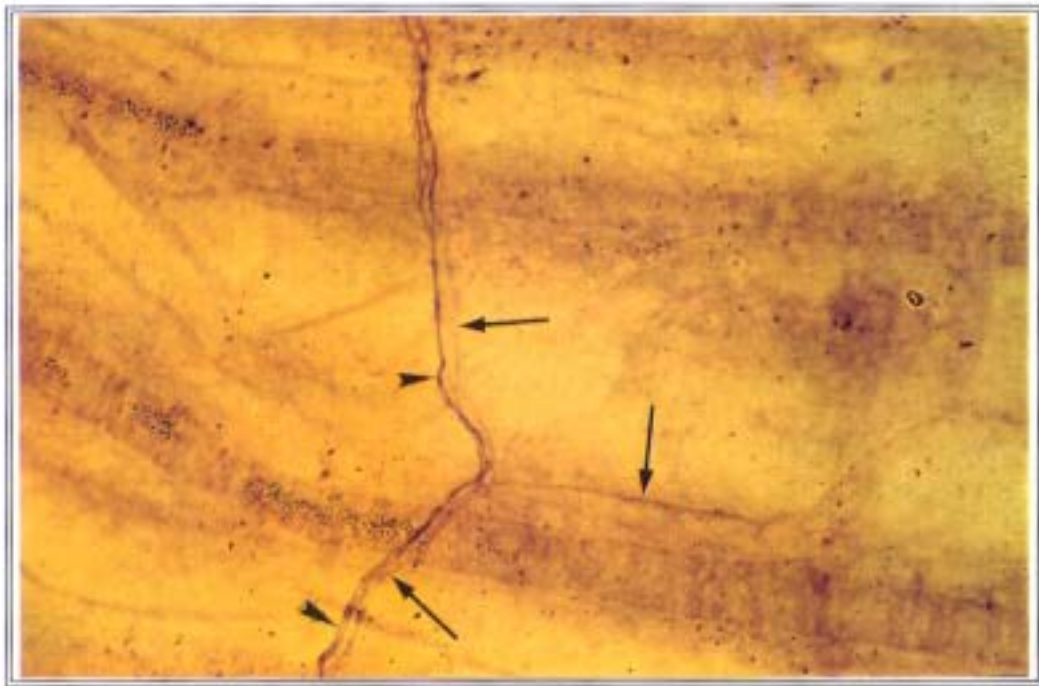


FIG. 49

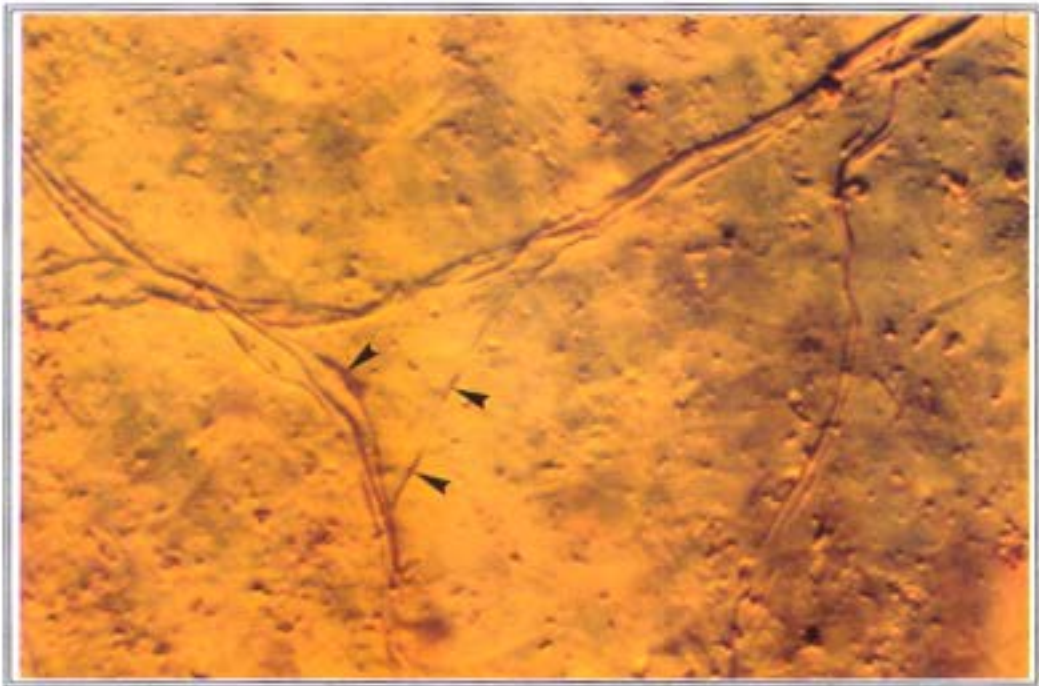


FIG. 50

Fig. 51(A,B) Detalles del contacto (→) de la fibra intervascular de largo recorrido con la pared de un gran vaso (★). [Montaje plano corioideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-160(+); 400x].

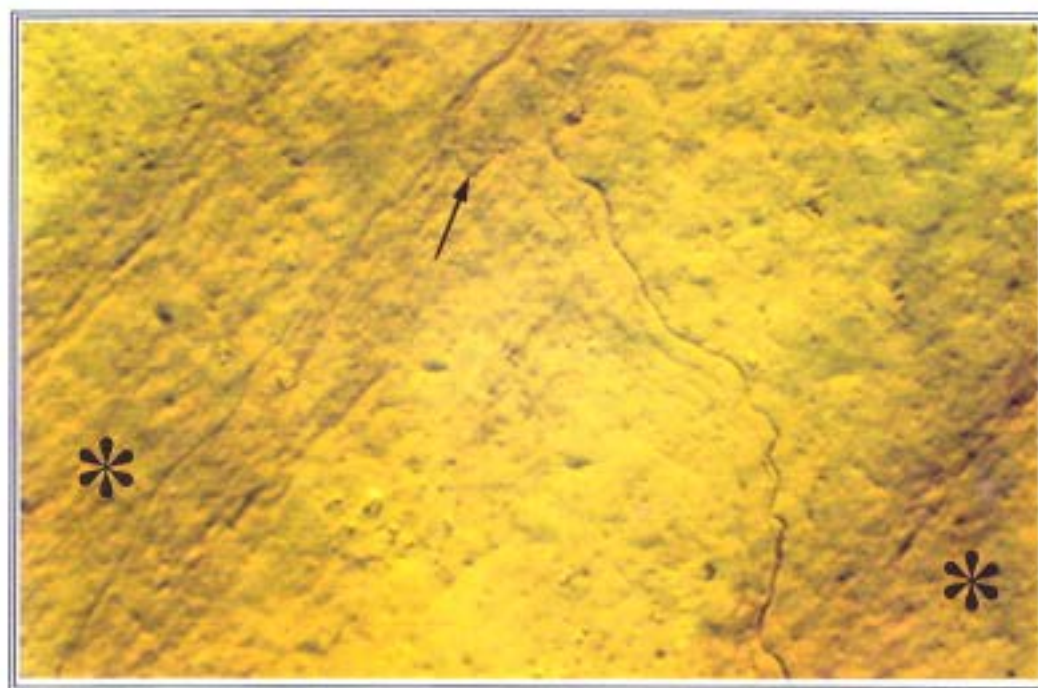


FIG. 51 A



FIG. 51 B

Fig. 52.- Celulas ganglionares (▲) formando parte de un plexo de fibras intervasculares. [Montaje plano corioideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-160; 250x].

Fig. 53.- Células ganglionares corioideas (▲) donde se aprecia: su naturaleza bipolar, su cuerpo fusiforme, y el núcleo NF-160(-) localizado centralmente. [Montaje plano corioideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-160; 400x].



FIG. 52



FIG. 53

Fig. 54.- Célula ganglionar coroidea aislada, de morfología bipolar (▲). Sus dos prolongaciones forman parte de las fibras intervasculares. [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-160; 400x].

Fig. 55.- Célula ganglionar coroidea aislada, de morfología multipolar (▲). De su cuerpo parten 4 prolongaciones (→), dos de las cuales van a formar parte de fibras intervasculares. [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-160; 400x].



FIG. 54

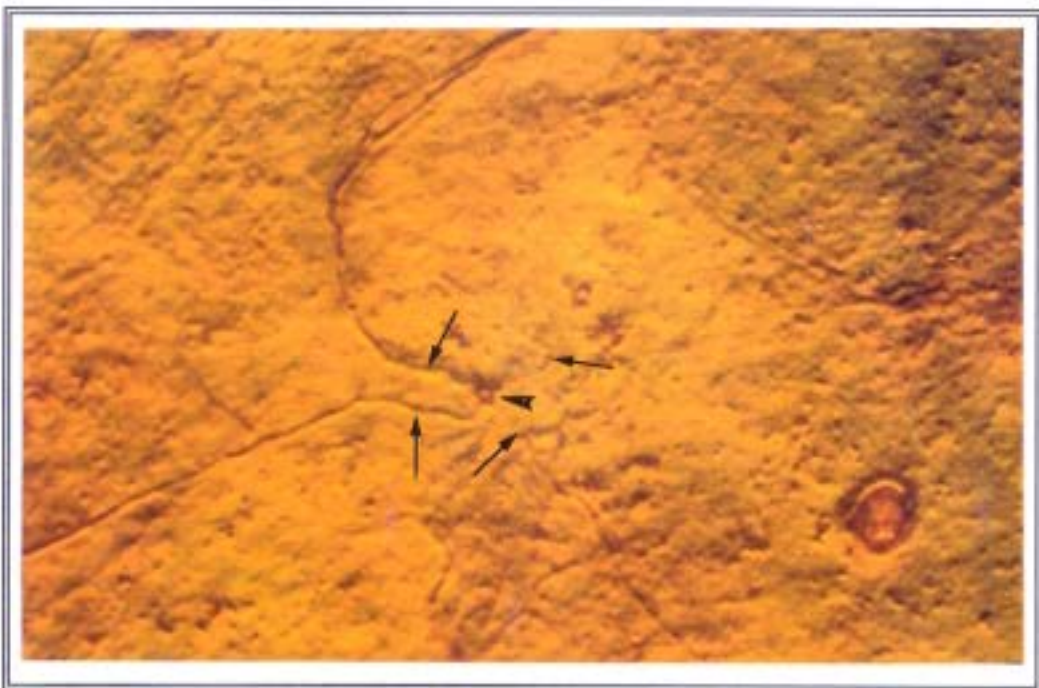


FIG. 55

Fig. 56.- Montaje plano coroideo donde se observa la inmunreactividad NF-200(+) alrededor de los vasos de mediano y gran calibre. [Inmunoperoxidasa con anti NF-200; 125X].

Fig. 57.- Micrografía de un gran vaso coroideo (★) donde observamos una intensa señal NF-200(+), tanto en las fibras perivasculares (→), como intervasculares (▲), así como los melanocitos (↑↑) que rodean al vaso. [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 250x].

Fig. 58.- Preparación coroidea control de la inmunoreactividad NF-200. Se aprecia la ausencia de señal frente al anticuerpo contra los neurofilamentos de peso molecular 200. [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; PAP, 250x].

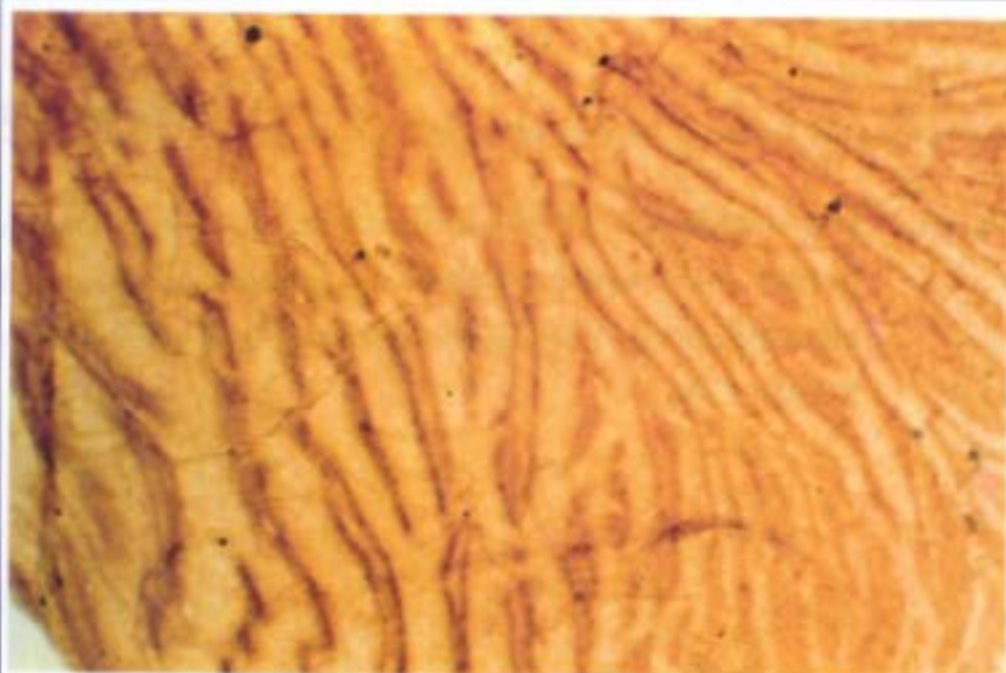


FIG. 56

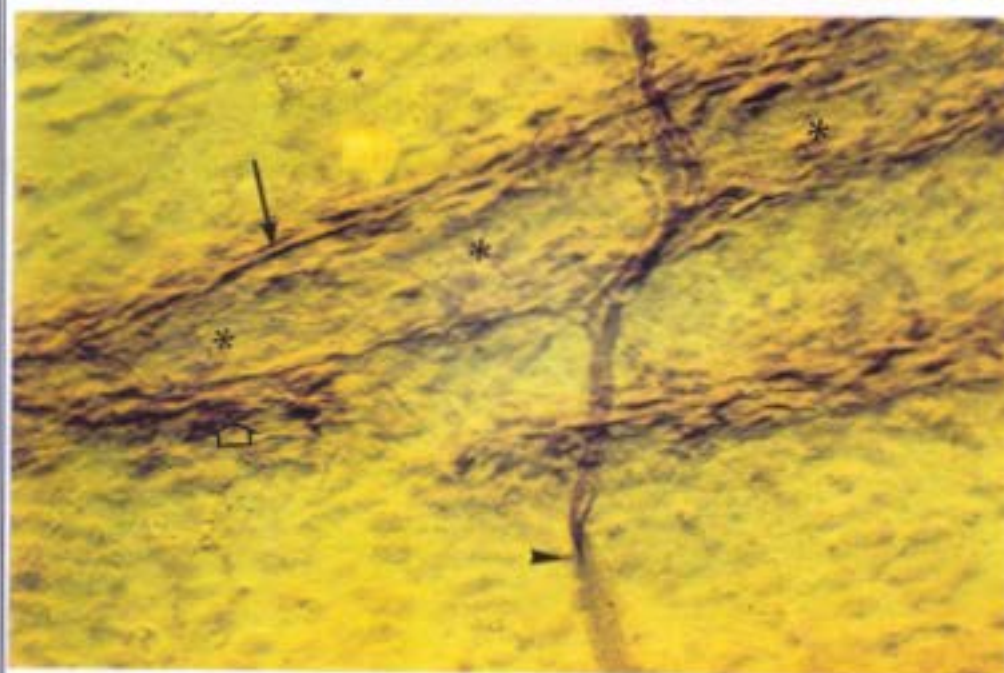


FIG. 57

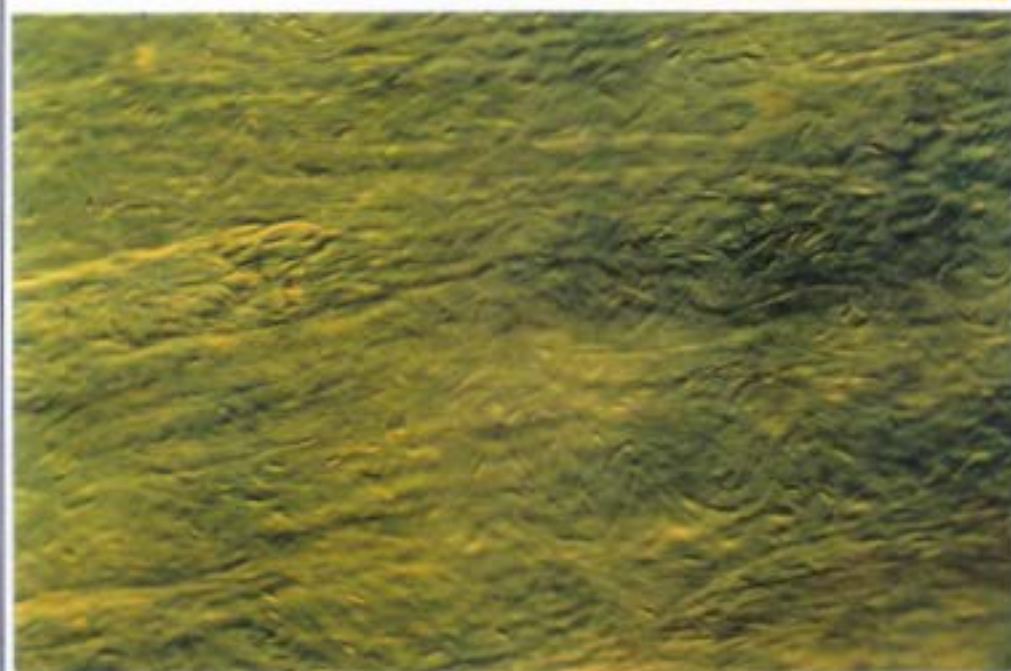


FIG. 58

Fig. 59.- Señal perivascular NF-200(+) (▲) rodeando los vasos coroideos de mediano y gran tamaño (★) debido a la presencia de múltiples fibrillas agrupadas entre sí. [Montaje plano coroideo; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 250x].

Fig. 60.- Detalle de la bifurcación de un gran vaso coroideo (★) donde se observa como las fibras perivasculares NF-200(+) (→) siguen a los vasos ramificándose con ellos. [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 400x].

Fig. 61.- Montaje plano coroideo en el que se pone de manifiesto las fibras perivasculares NF-200(+) (▲), y las fibras intervasculares NF-200(+) (→). Se puede observar como la señal perivascular (+++++) es de mayor intensidad que la intervascular (+++). [Inmunoperoxidasa con anti NF-200; 250x].



FIG. 59

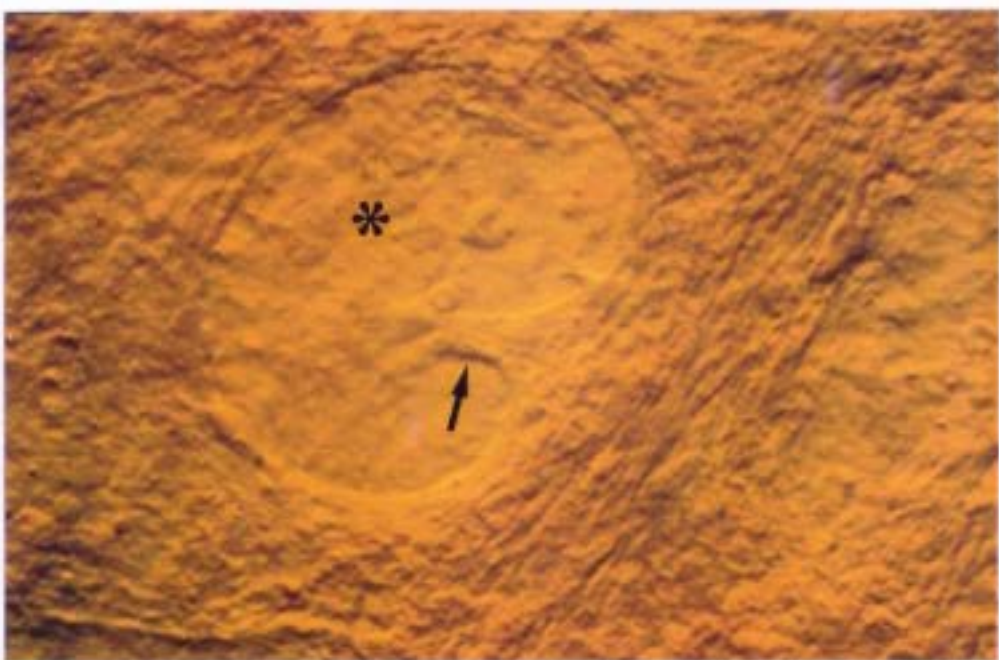


FIG. 60

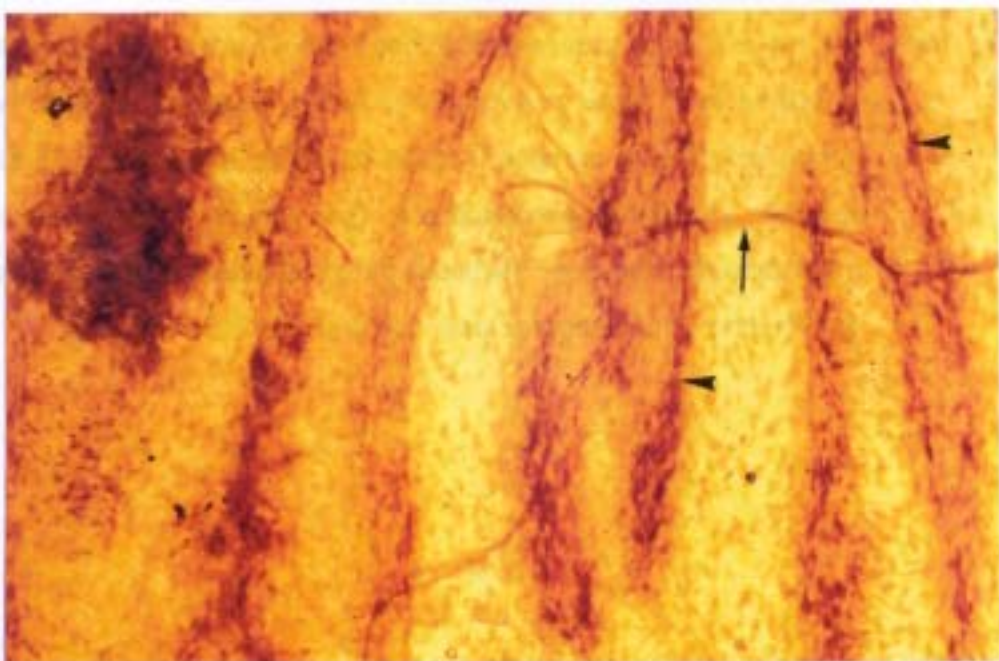


FIG. 61

Fig. 62.- Micrografía de la zona de transición entre la coroides y el cuerpo ciliar en la que se observa fibras nerviosas NF-200(+) (→). [(P): proceso ciliar; montaje plano uveal; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 400x].

Fig. 63.- Detalle de las relaciones de las fibras perivasculares (▲) de un gran vaso (*) con las fibras perivasculares de un vaso de menor calibre vecino (★). [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 400x].

Fig. 64.- Micrografía de un gran vaso coroideo (★) en la que se pone de manifiesto la existencia de fibras perivasculares finas (▲) que partiendo de la pared lateral del vaso se agrupan a modo de collar rodeándolo. También se aprecian las fibras perivasculares que siguen longitudinalmente la trayectoria del vaso (→). [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 400x].

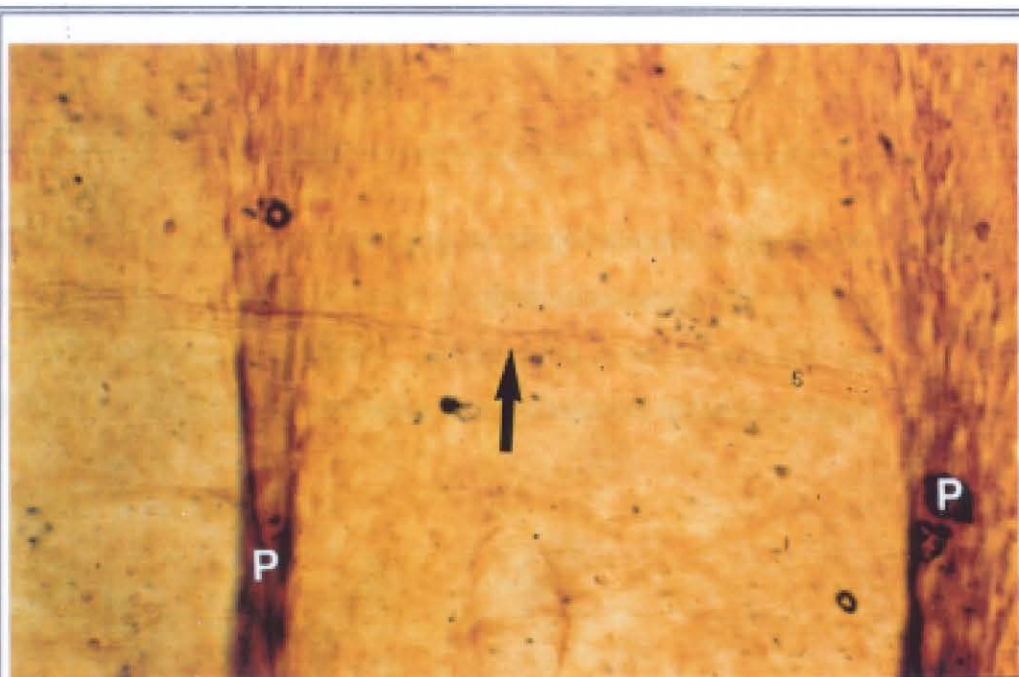


FIG. 62

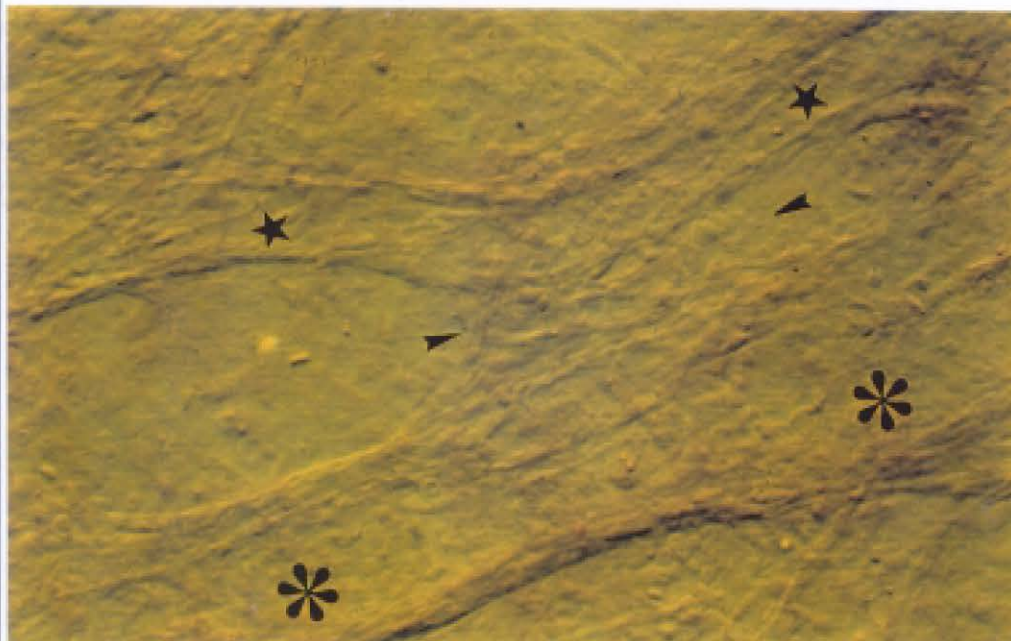


FIG. 63

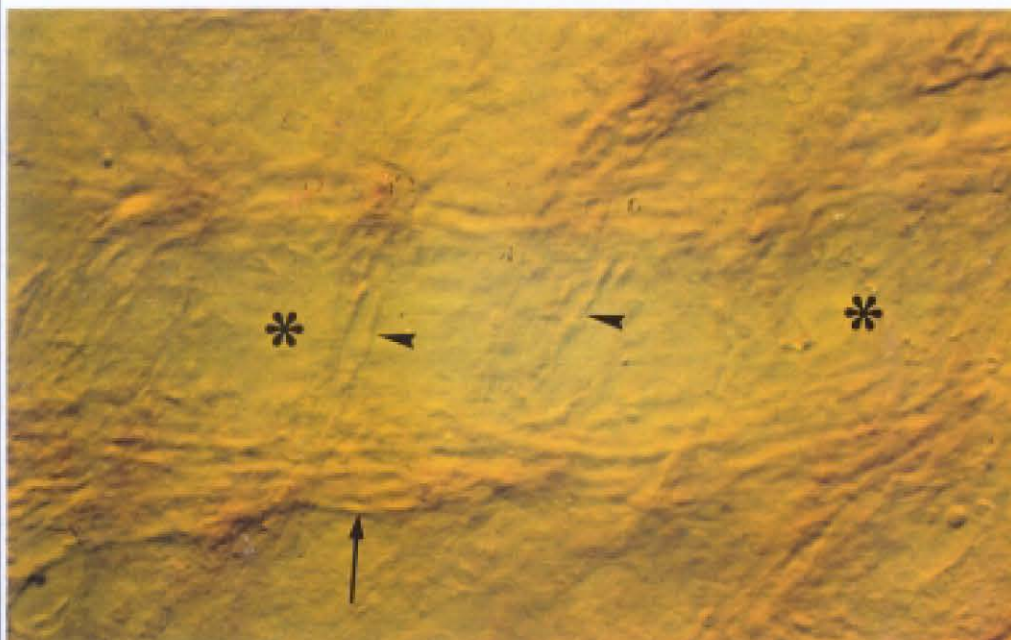


FIG. 64

Fig. 65.- Detalle de la bifurcación de un gran vaso coroideo (★) donde se puede apreciar un extenso entramado de fibras NF-200(+) (→) procedentes de las dos ramas de la bifurcación. [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 400x].

Fig. 66.- Fibra intervascular NF-200(+) (→) que se va ramificando progresivamente disminuyendo de tamaño. Sus ramas se relacionan con las paredes de los vasos (★). [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 250x].

Fig. 67.- Nervio ciliar largo formado por un gran número de fibras intensamente NF-200(+) (+++++) que se agrupan formando un fascículo acintado (▲). [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 400x].

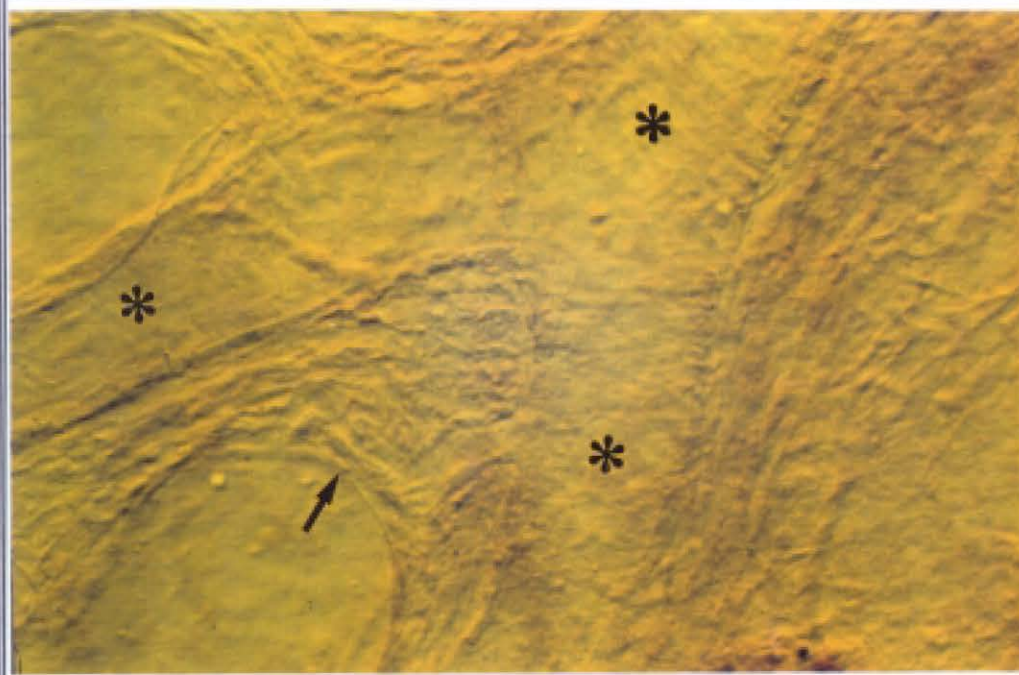


FIG. 65

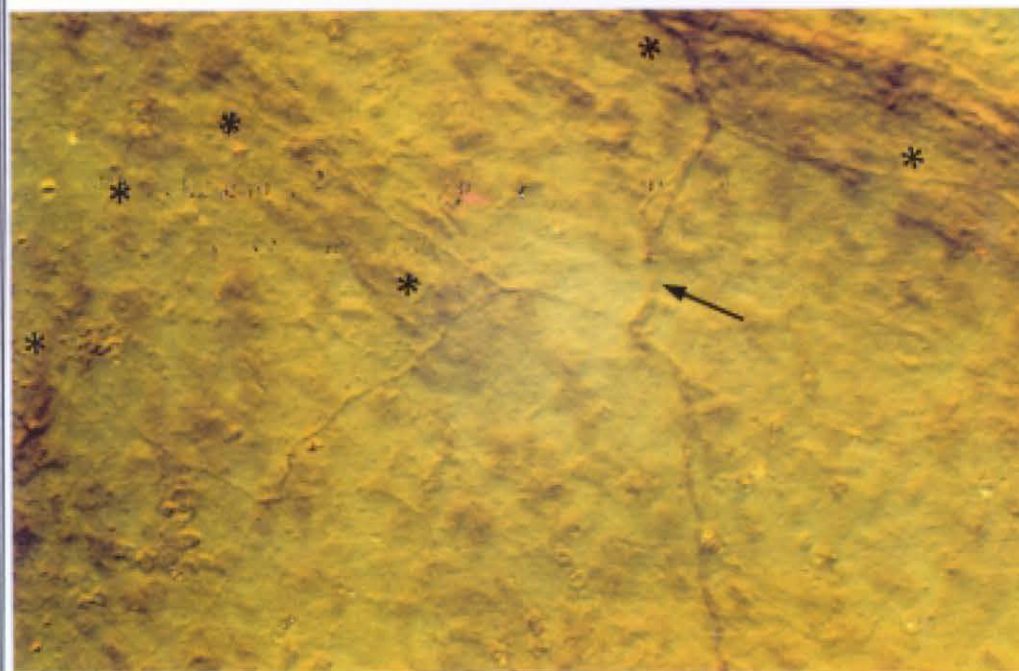


FIG. 66

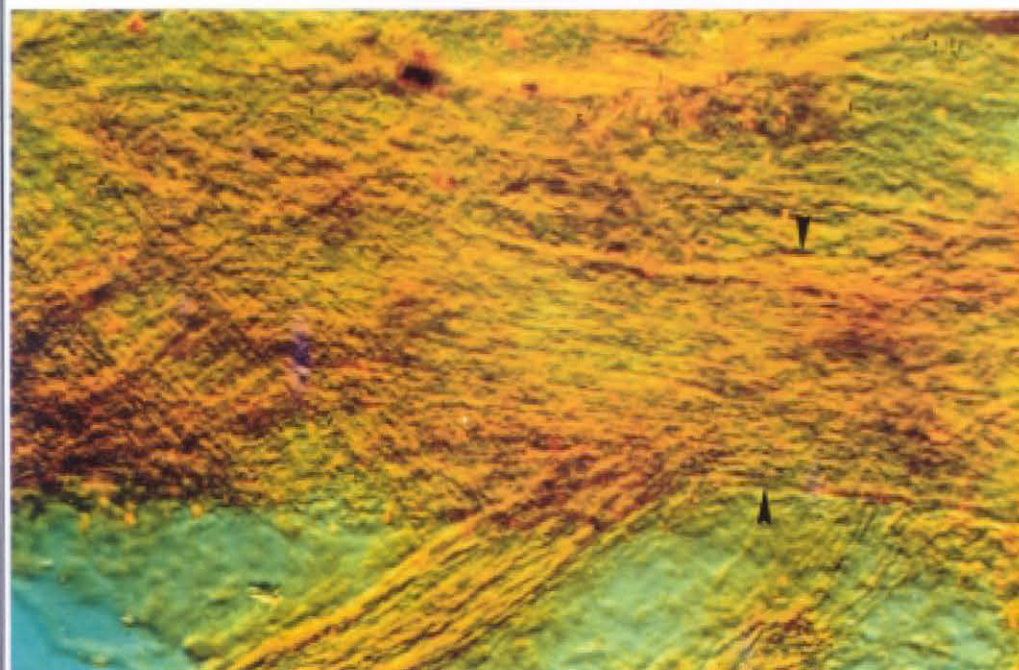


FIG. 67

Fig. 68.- Micrografía en la que podemos observar un fascículo acintado NF-200(+) (→), constituido por 5-10 fibrillas nerviosas que se ramifican en otras de menor número de fibras (▲). Estas ramas se aproximan a las paredes vasculares (★). [Montaje plano corioideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 400x].

Fig. 69.- Fibra intervascular NF-200(+) que se situa paralela a la pared de un gran vaso (★), se ramifica (▲) y dirige a la pared de un vaso vecino (★) formando parte del sistema paraarterial. [Montaje plano corioideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 400x].

Fig. 70.- Fascículo de fibras nerviosas intervasculares grueso (↑) que se ramifica en otro menor (→), dando una pequeña rama (▲) que llega a contactar con la pared de un gran vaso (★). [Montaje plano corioideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 500x].

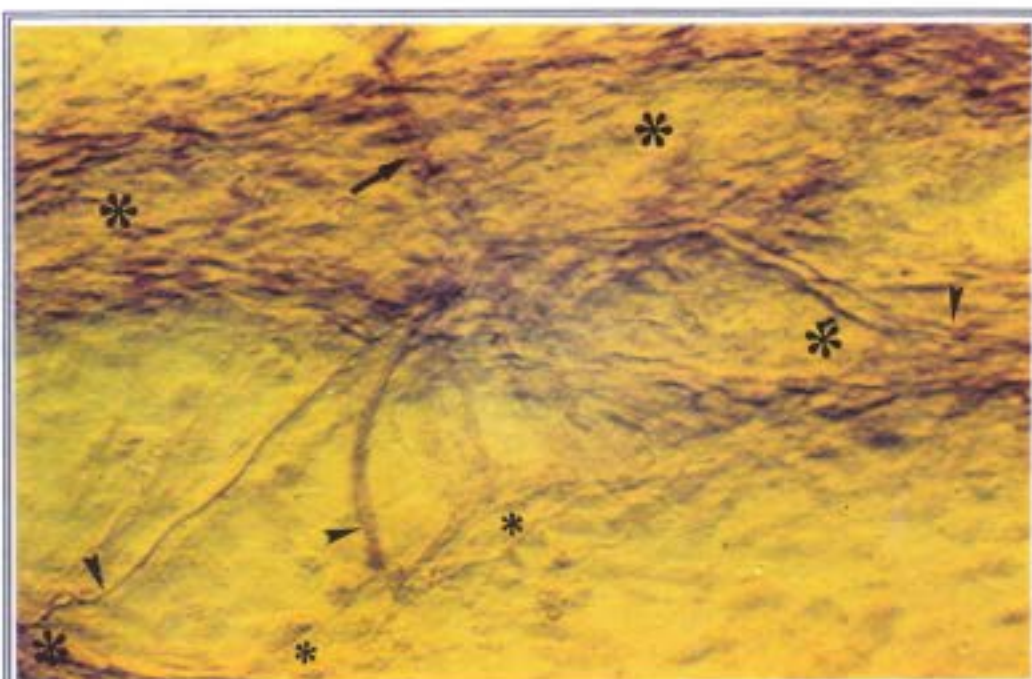


FIG. 68

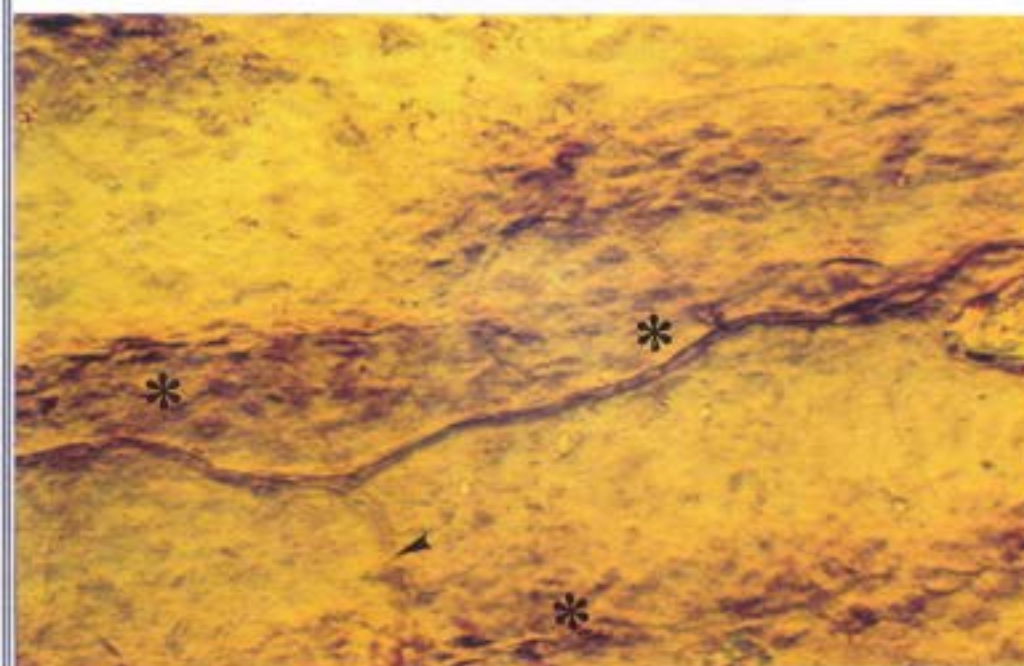


FIG. 69

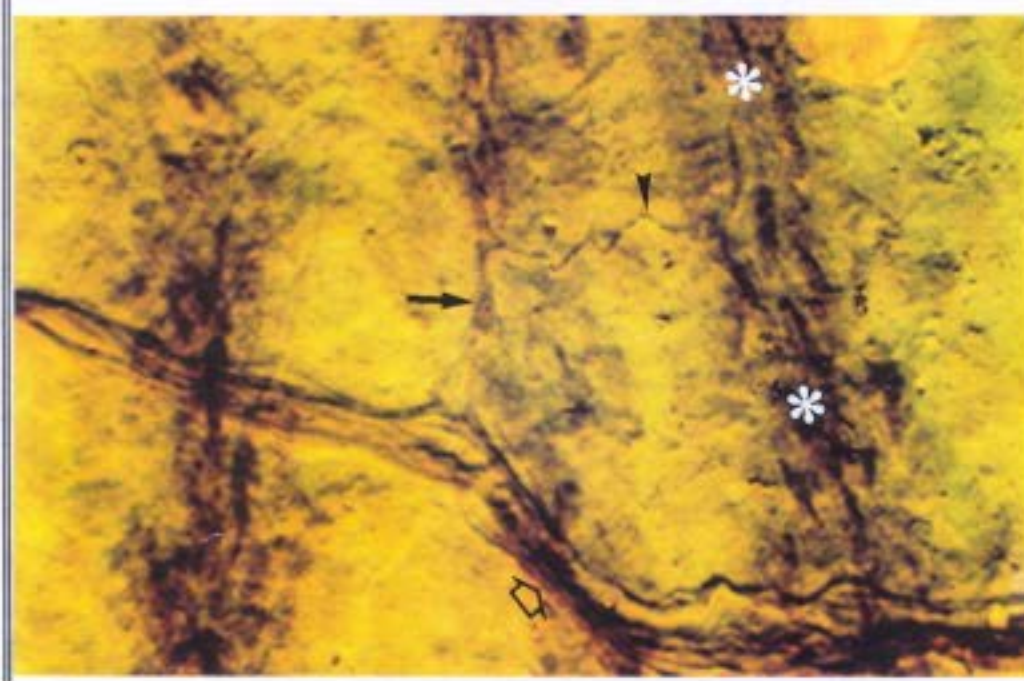


FIG. 70

Fig. 71.- Fascículos nerviosos paravasculares NF-200(+) (→) que dan ramas de calibre extremadamente fino (▲) que realizan contactos con las paredes vasculares (★). [Montaje plano coroideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 400x].

Fig. 72.- Fibras intervasculares NF-200(+) (▲) en la zona de transición cilio-coroidea. [(P): proceso ciliar; montaje plano uveal; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 250x].

Fig. 73.- Fascículos nerviosos NF-200(+) (→) en la zona de transición cilio-coroidea. [(P): proceso ciliar; montaje plano uveal; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 400x].

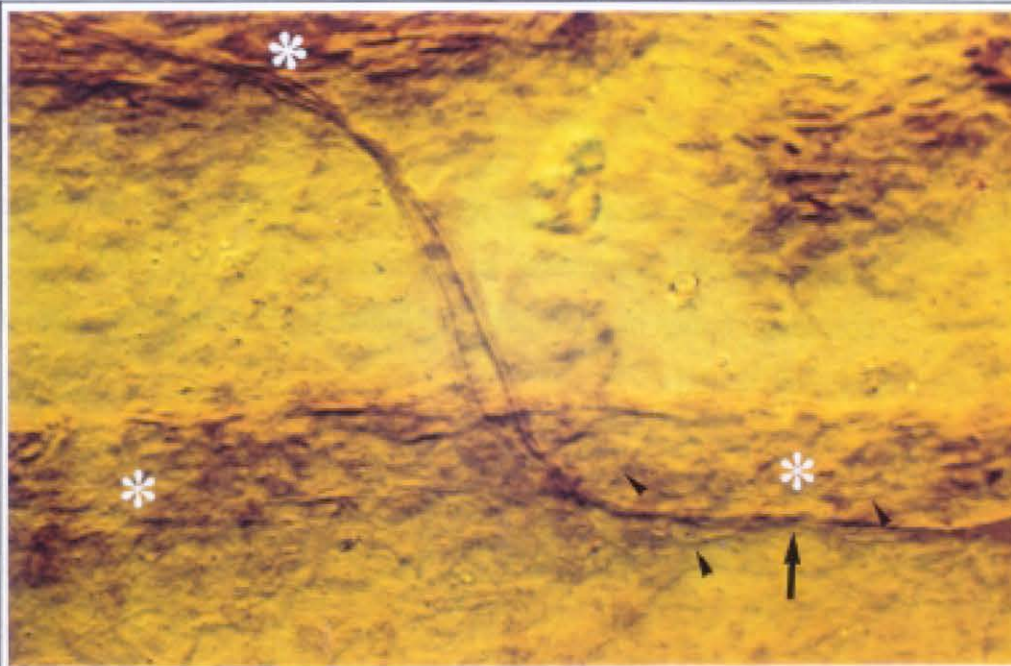


FIG. 71

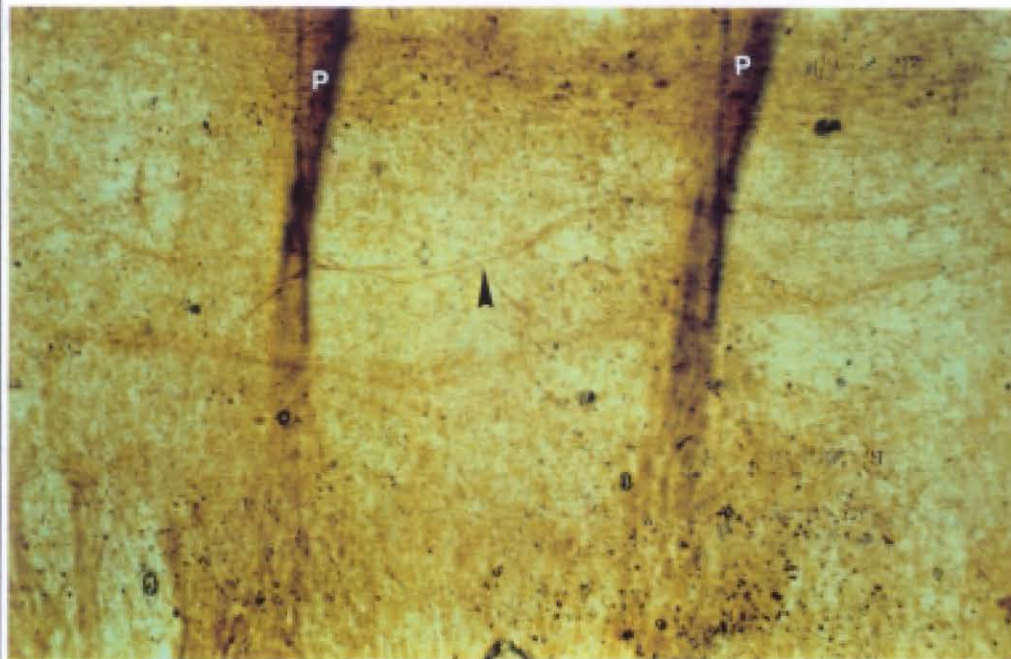


FIG. 72

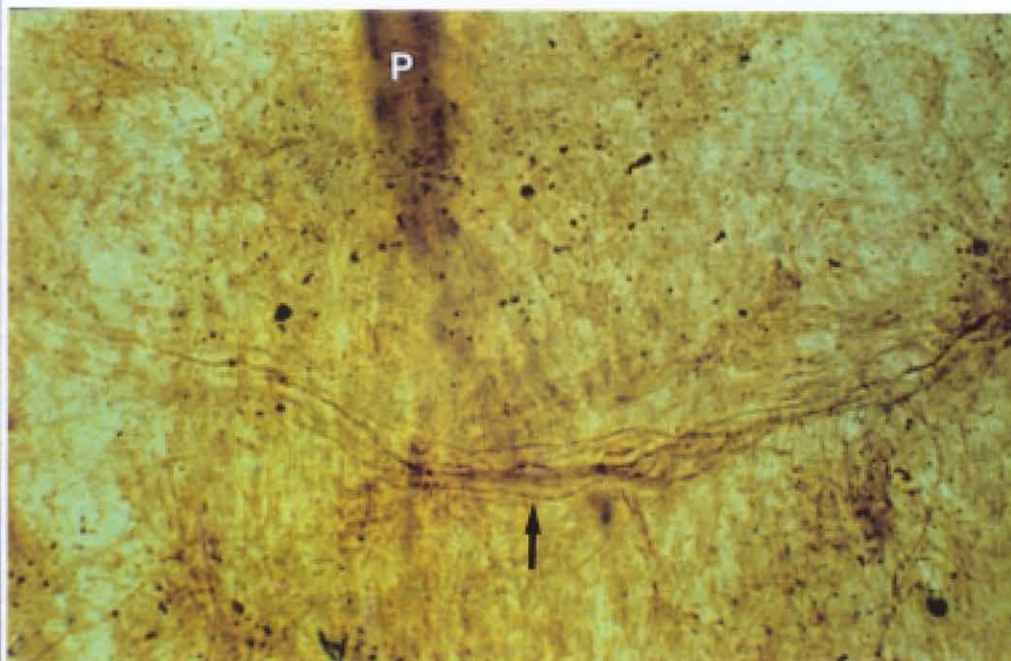


FIG. 73

Fig. 74.- Fibra intervascular de largo recorrido NF-200(+) que se ramifica. Se puede observar claramente su naturaleza doble (▲). [Montaje plano cororideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 250x].

Fig. 75.- Fibra intervascular múltiple de largo recorrido NF-200(+) (→) que da fibras (∩) que se dirigen hacia un vaso sanguíneo (★), de las que parten fibrillas (▲) que contactan con la pared vascular. [Montaje plano cororideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 500x].

Fig. 76.- Micrografía de la coroides periférica donde se observan dos células ganglionares. la superior (→) presenta un cuerpo fusiforme con dos prolongaciones alargadas que parten de cada polo; la inferior (▲) presenta un cuerpo triangular del que parten tres prolongaciones alargadas. Ambas células poseen un núcleo central NF-200(-). [Montaje plano cororideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 500x].

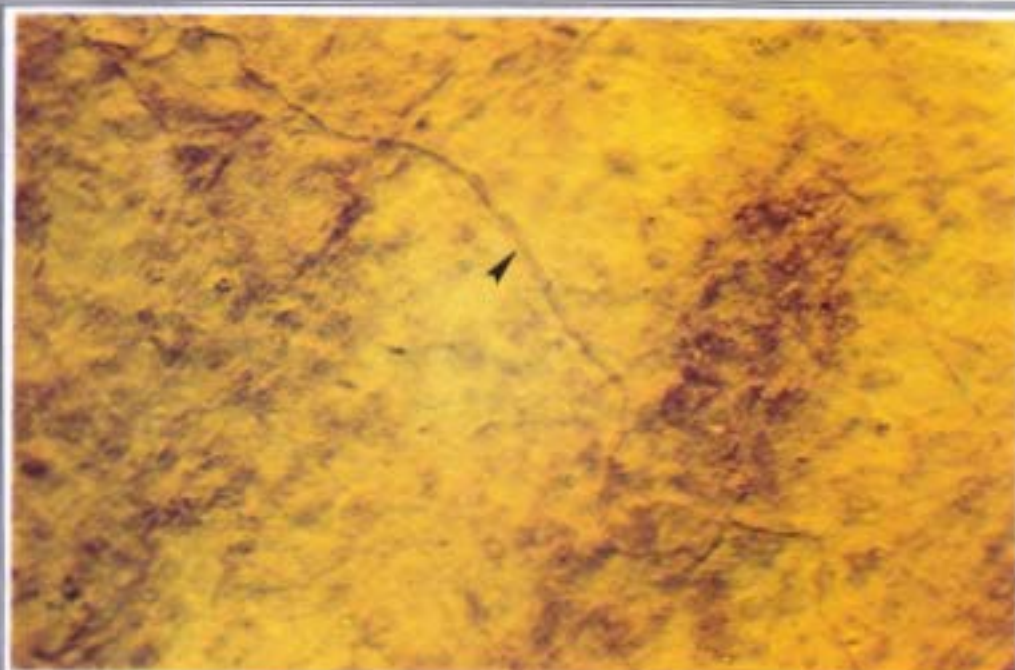


FIG. 74

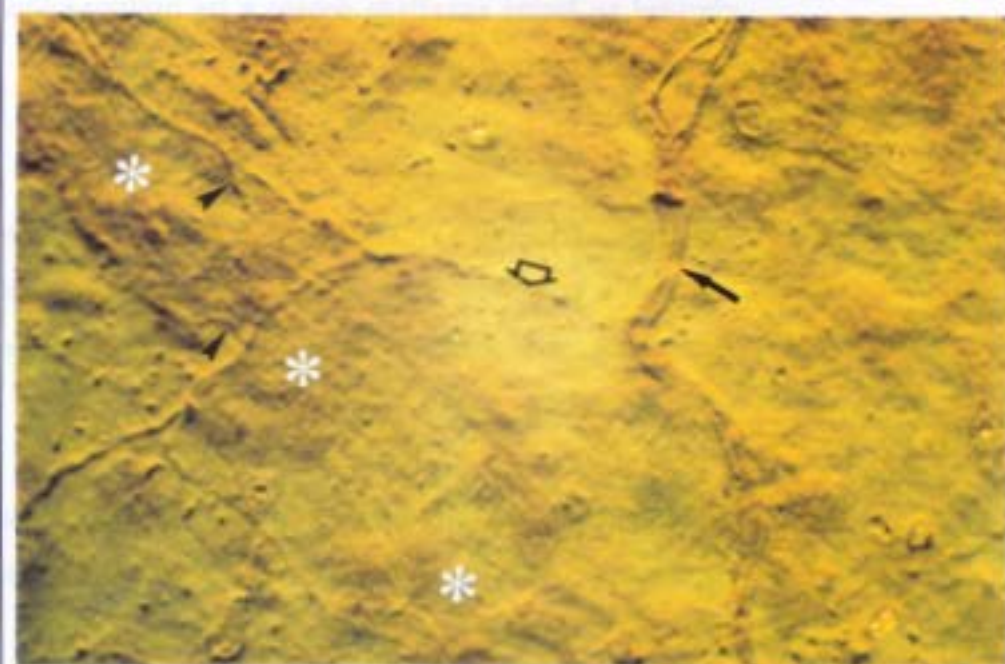


FIG. 75

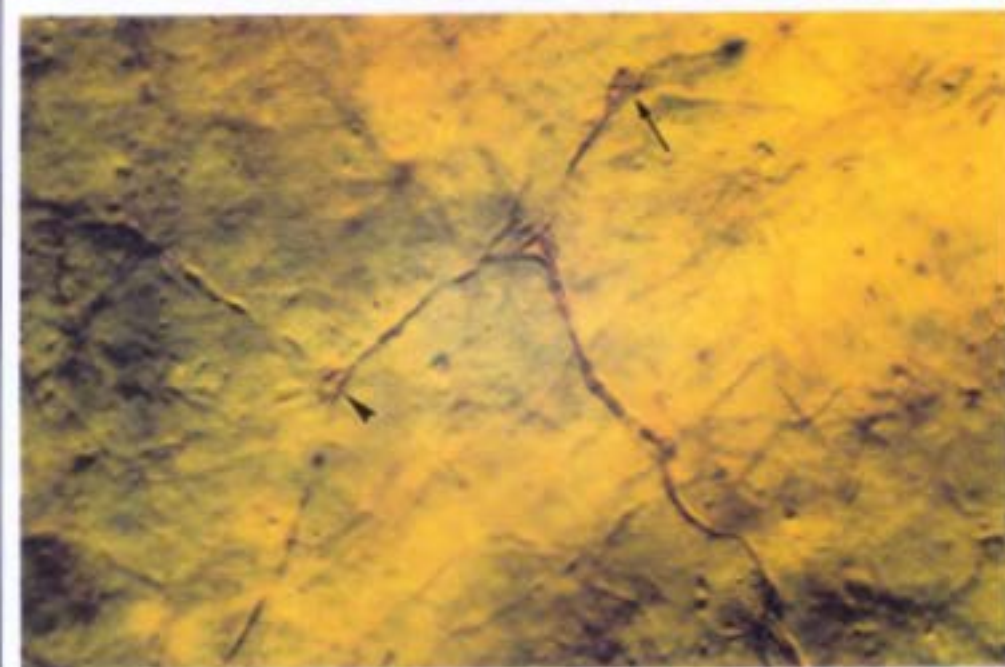


FIG. 76

Fig. 77(A,B;C) Melanocitos coroides.

[Montaje plano corioideo; óptica interferencial de Nomarski; inmunoperoxidasa con anti NF-200; 500x].

- (A): Melanocitos NF-200(+) (▲) situados próximos a la pared de un vaso (★). En uno de ellos (→) se puede observar con claridad su forma estrellada debido a las prolongaciones que parten de su citoplasma.
- (B): Melanocito NF-200(+) (→) situado en el estroma corioideo muy próximo a una fibra intervascular (||); también se observan numerosos melanocitos (▲) en las paredes vasculares (★).
- (C): Fibra intervascular NF-200(+) muy próxima a melanocitos coroides situados en la pared de un gran vaso (★), mostrando aparentes conexiones (▲) con alguno de ellos.

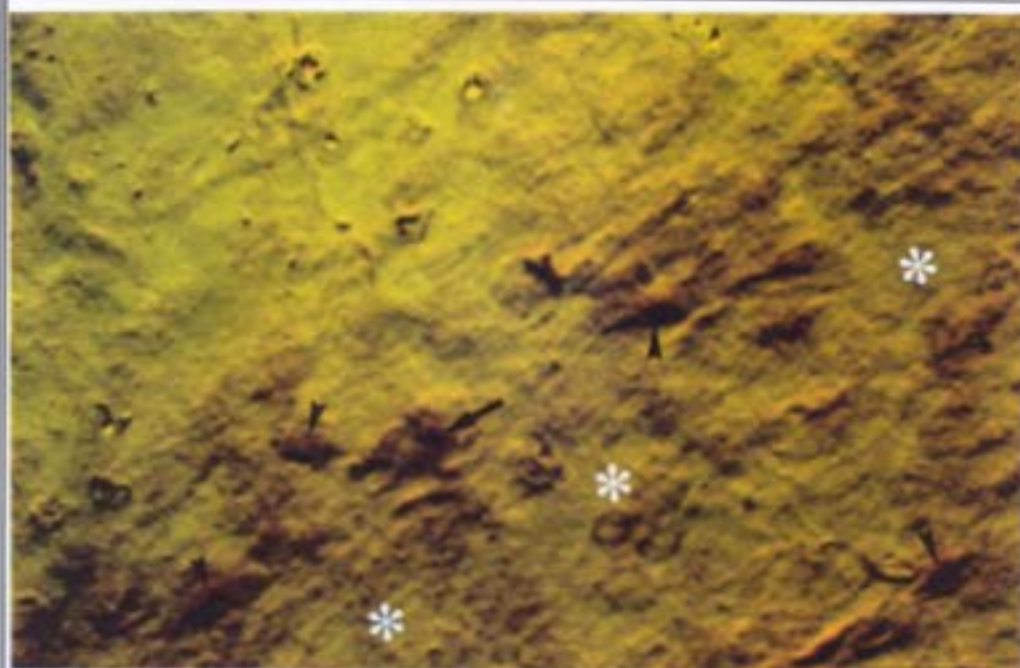


FIG. 77 A

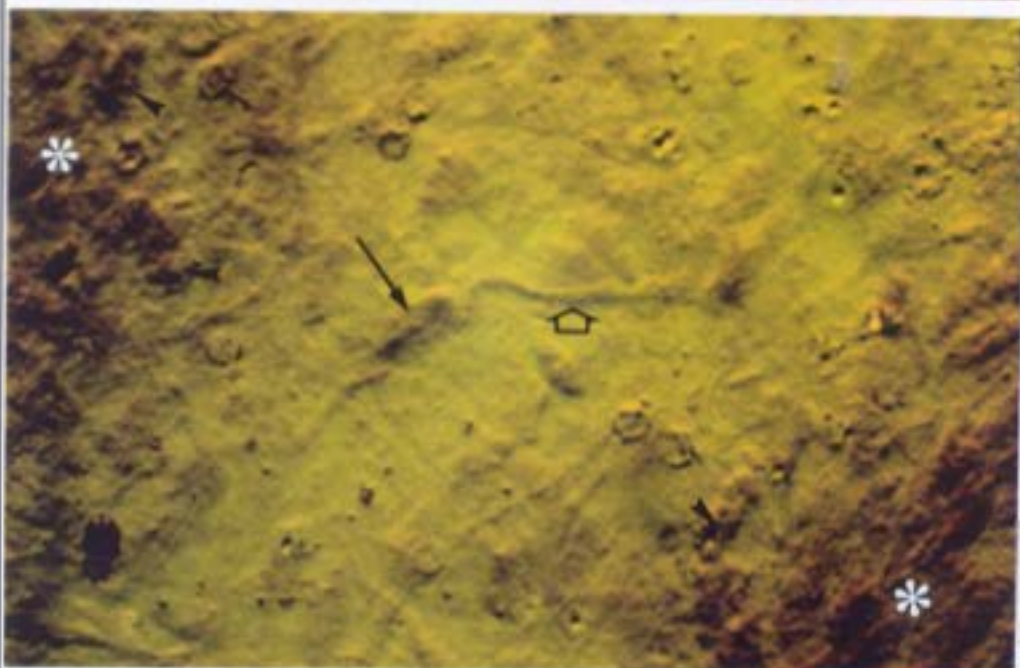


FIG. 77 B

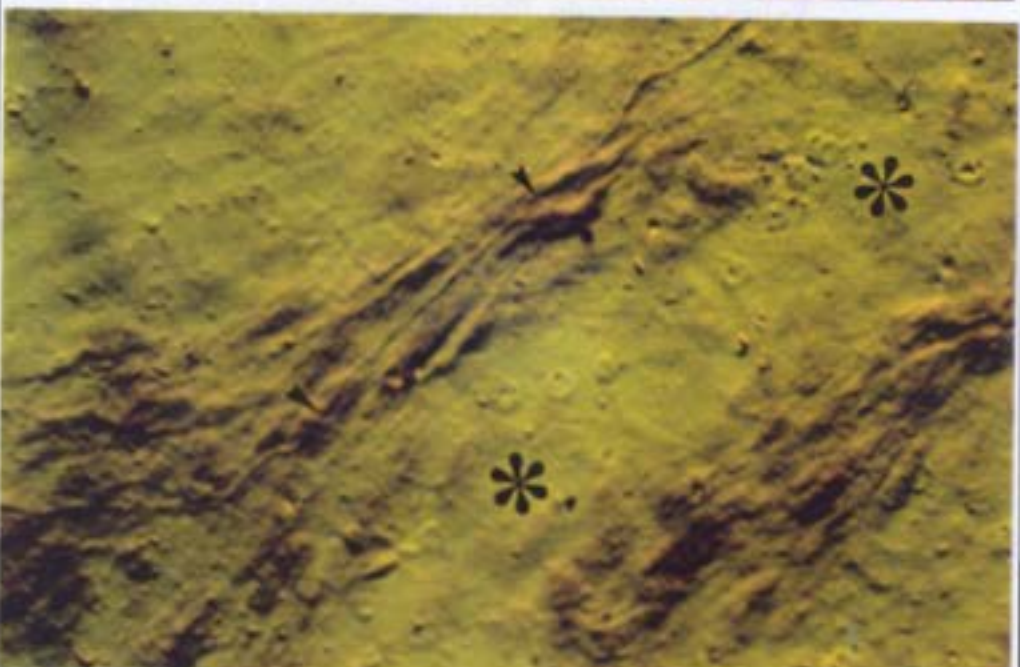


FIG. 77 C

Fig. 78.- Esquema tridimensional de un gran vaso coroideo mostrando una bifurcación.

Se han representado, fibras perivasculares circulares a lo largo de todo el trayecto vascular, alguna de las cuales adopta forma similar a un diapasón; así cómo, una fibra nerviosa paravascular del sistema paraarterial que emite una ramificación que se dirige hacia la pared del vaso. Por último, también se ha representado el entramado nervioso que se distribuye entre las dos ramas de la bifurcación.

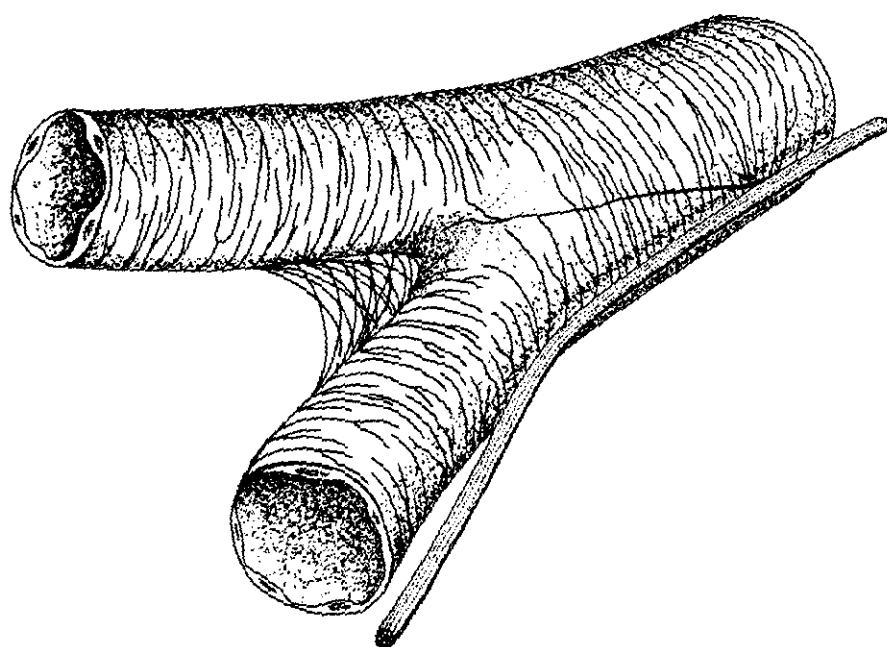


Fig. 79.- Esquema tridimensional de la coroides donde se ha representado la capa de medianos y grandes vasos, la coriocapilar, la membrana de Bruch, y el epitelio pigmentario.

A nivel de la supracoroides, se muestra como penetra un nervio ciliar, que va dando ramas que se distribuyen entre los vasos coroideos de mediano y gran tamaño constituyendo las fibras intervasculares.

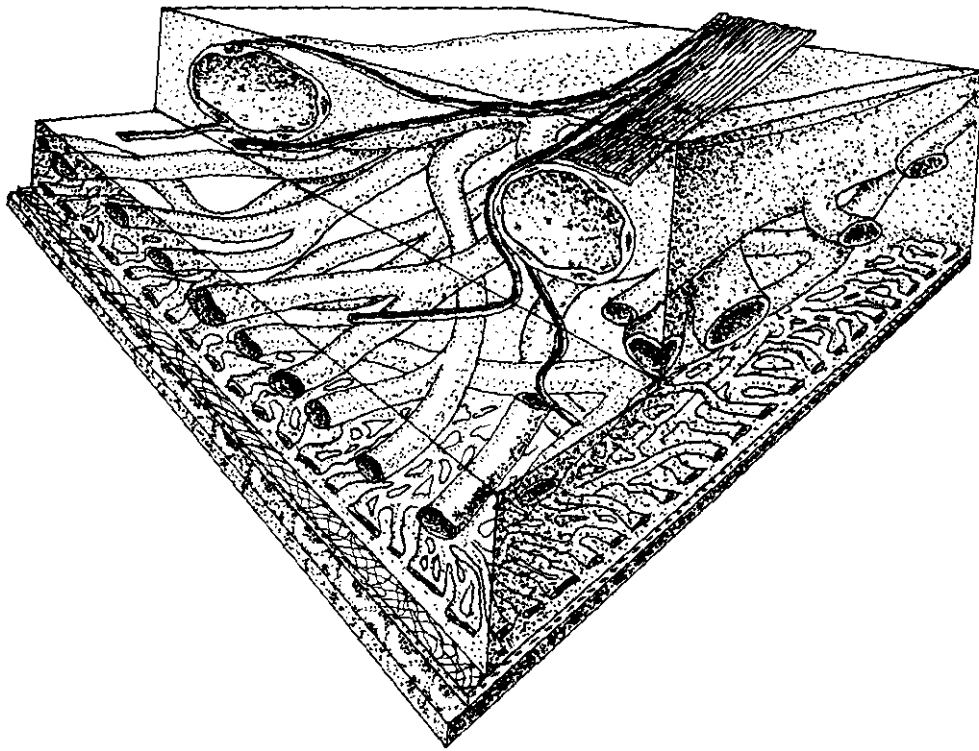


Fig. 80.- Esquema tridimensional de la coroides donde se ha representado la capa de grandes y medianos vasos, y la coriocapilar.

En la supracoroides se muestra una fibra intervascular gruesa con ensanchamientos periódicos de los que parten fibrillas que se dirigen hacia los vasos, también se ha representado la disposición y distribución que presentan los melanocitos en la supracoroides y entre los vasos de mediano y gran tamaño.

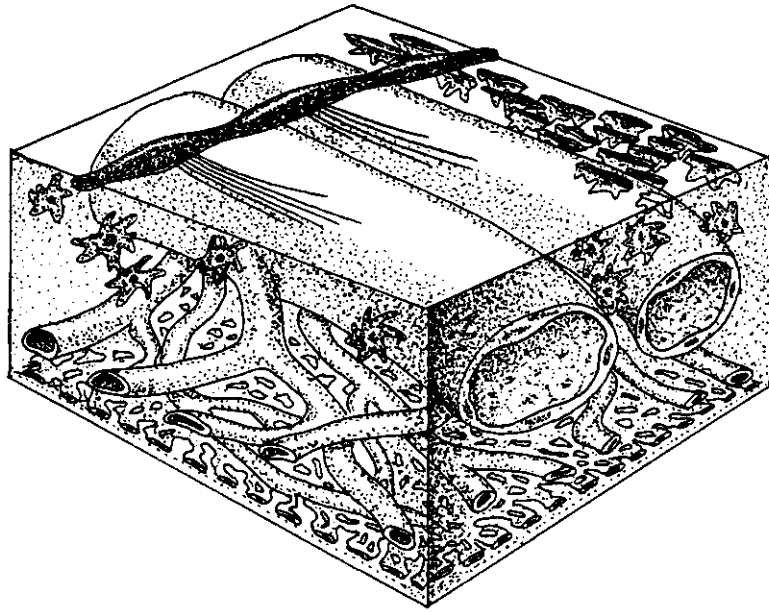


Fig. 81.- Dibujo representativo de una fibra intervascular de largo recorrido formada por cuatro filamentos: dos gruesos y dos finos.

Se muestra como en la bifurcación, da ramas compuestas por dos filamentos (uno fino y otro grueso) para cada brazo de la misma. De estas ramas parten otras de menor calibre que se dirigen hacia la pared del vaso.

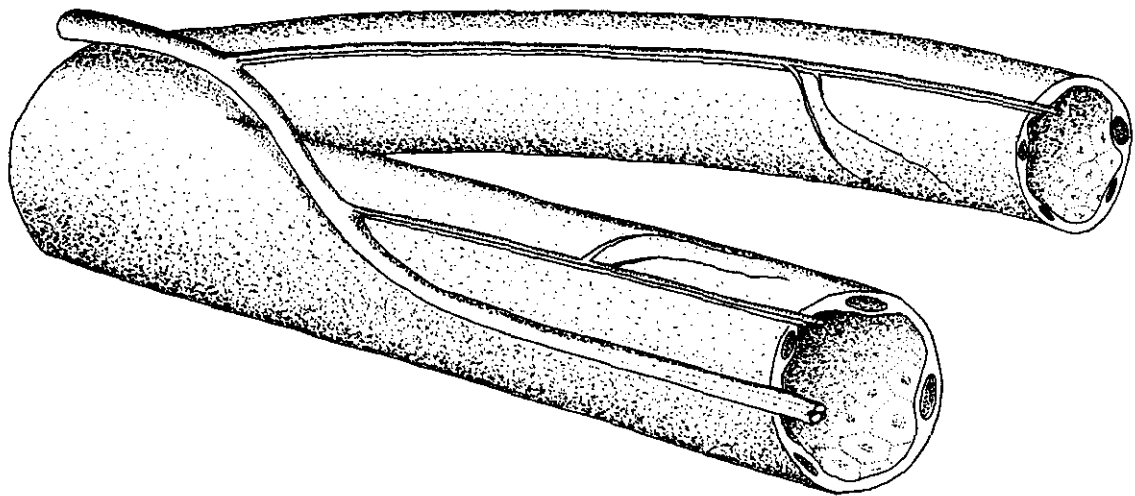
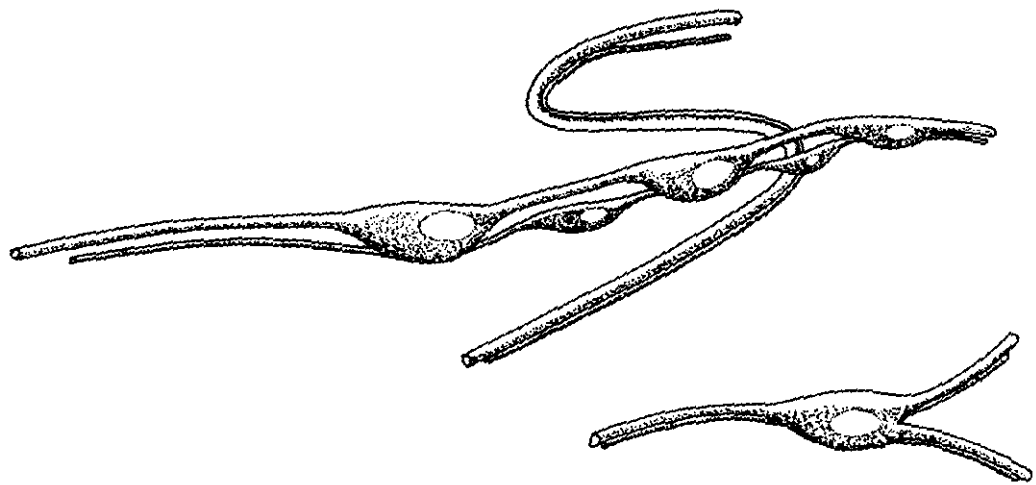


Fig. 82.- Dibujo representativo de un grupo de células ganglionares de morfología bipolar formando parte de los filamentos gruesos y finos de una fibra intervascular de largo recorrido.

En la parte inferior derecha del esquema está representada una célula ganglionar de morfología multipolar.



INTENSIDADES DE LA INMUNORREACTIVIDAD

| | NF-68 | NF-160 | NF-200 | PGFA |
|----------------------------------|--------------|---------------|---------------|-------------|
| PERIVASCULAR | + | +++ | ++++ | + |
| INTERVASCULAR | ++- | ++++ | +++ | ++ |
| TRANSICION CILIO-COROIDEA | ++++ | +++ | +++ | |

Fig. 83.- Tabla esquemática donde se compara la intensidad de la inmunorreactividad de los diferentes anticuerpos en las distintas zonas coroideas.

5.- DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN.

5.1.- LOCALIZACIÓN DE LAS FIBRAS NERVIOSAS COROIDEAS.

La localización de las fibras nerviosas en la coroides ha sido un tema discutido desde que MÜLLER (1857)⁸⁷ reconociera la existencia de plexos de haces de fibras nerviosas a los lados de las arterias coroideas,

Con la utilización de las técnicas de plata, la totalidad de los autores, coinciden al observar que las fibras nerviosas coroideas son fundamentalmente vasculares, encontrándose localizadas en relación con los vasos tanto arteriales como venosos (SCHWEIGGER, 1860¹⁰⁸; BIETTI, 1895a,b^{5,6}; SALZMANN, 1912¹⁰⁶; ERNYEI, 1934³⁴; ROSSI, 1936¹⁰¹; MATTEUCCI, 1949⁷⁹; MAWAS, 1936⁸³; WOLTER, 1960¹⁴⁸; BEATIE, 1961³; CASTRO-CORREIA, 1961,1965,1967¹⁸⁻²⁰).

Algunos de ellos, además observaron que las fibras nerviosas vasculares alcanzan la coriocapilar (ROSSI, 1936¹⁰¹; MATTEUCCI, 1949⁷⁹; WOLTER, 1960¹⁴⁸; CASTRO-CORREIA, 1961,1967^{18,20}). Y finalmente, ROSSI (1936)¹⁰¹ y

MATTEUCCI (1949)⁷⁹ describen la presencia de fibras nerviosas que se extienden desde la coriocapilar al epitelio pigmentario retiniano sin interrupción.

Nosotros, al estudiar los montajes planos de coroides, con las técnicas de plata, hemos podido constatar al igual que todos los autores que emplearon técnicas argénticas, que la inervación coroidea es vascular y las fibras nerviosas coroides se encuentran en relación con las paredes arteriales y venosas de los grandes y medianos vasos.

Sin embargo, en contra de las observaciones de ROSSI (1936)¹⁰¹, MATTEUCCI (1949), WOLTER (1960)¹⁴⁸ y CASTRO-CORREIA (1961,1967)^{18,20}, no hemos encontrado en ninguna de nuestras preparaciones la existencia de fibras a nivel de la coriocapilar; lo que coincide con las observaciones de LYNETTE-FEENEY y HOGAN (1961a,b)^{69,70} quienes al estudiar la coroides mediante microscopía electrónica, confirman la disposición de las fibras en relación con los vasos a través de todo el estroma vascular con excepción de la coriocapilar.

Posteriormente, con la introducción de las técnicas histoquímicas de FALCK y HILLARP (1962a,b,1965)³⁷⁻³⁹ para marcar las fibras nerviosas adrenérgicas, todos los autores que han empleado este método, vuelven a coincidir en que las fibras adrenérgicas coroides son vasculares, encontrándose fundamentalmente asociadas a

los vasos formando un plexo perivascular (EHINGER, 1964,1966a,b,c,d,e,²⁶⁻³¹; HAGGENDAL, 1965⁵²; MALMFORS, 1965⁷⁸; LATIES, 1966,1974^{64,65}; FUKUDA, 1979⁴⁴; GUGLIELMONE, 1982⁴⁹; NUZZI, 1992⁹⁴).

Sin embargo, con esta técnica de marcaje específico de las fibras adrenérgicas, nuevamente no vuelve a existir acuerdo sobre la presencia o no de fibras nerviosas en la coriocapilar. Así, hay autores como EHINGER (1966a,b,c,d,e²⁷⁻³¹), MALMFORS (1965)⁷⁸, LATIES (1966)⁶⁴ y MATSUSAKA (1982)⁸¹, que describen fibras nerviosas alcanzando la coriocapilar; mientras que, por el contrario, LATIES (1974)⁶⁵, GUGLIELMONE (1982)⁴⁹ y NUZZI (1992)⁹⁴, afirman que las fibras adrenérgicas nunca atraviesan la coriocapilar, llegando sólo hasta su vecindad.

Paralelamente a estos trabajos con técnicas histoquímicas, los estudios con microscopía electrónica (RUSKELL, 1971¹⁰⁵; BERGMANSON, 1977⁴) demuestran fibras nerviosas en la vecindad de la coriocapilar en escasas ocasiones, pero nunca dentro de ella. Aunque MATSUSAKA (1982)⁸¹ observa terminaciones nerviosas en contacto próximo con los melanocitos, cerca de la coriocapilar, y en dicha capa.

Recientemente, FLÜGEL-KOCH (1994a,b)^{40,41}, utilizando la técnica histoquímica de la enzima NADPH diaforasa (presente en los axones del S.N.P.),

demuestra la presencia de fibras nerviosas próximas a las arterias ciliares coroideas y a sus principales ramas, excepto en los capilares; demostrándose otra vez más, con otra técnica nueva, que las fibras nerviosas en la coroides son vasculares y que no se encuentran en la coriocapilar.

Después de los trabajos con técnicas histoquímicas, son numerosos los autores que estudian la inervación coroidea empleando técnicas inmunohistoquímicas usando marcadores de los neuropéptidos o sustancias peptídicas transportadas por los axones coroideos, completando asimismo sus trabajos con denervaciones para determinar el origen simpático/parasimpático o sensitivo de las fibras nerviosas coroideas.

El neuropéptido más utilizado es el VIP o polipéptido vasoactivo intestinal, que es transportado en los axones del Sistema Parasimpático. Todos los autores que utilizan anticuerpos frente al VIP demuestran fibras nerviosas coroideas VIP inmunopositivas alrededor de los vasos coroideos, principalmente en los vasos de mediano y pequeño calibre, tanto en ojos humanos como en animales de experimentación (UDDMAN, 1980¹⁴⁰; TERENCEHI, 1982¹³²; MILLER, 1983⁸⁵; UUSITALO, 1984,1985^{142,143}; y STONE, 1986b,c^{123,124}).

Tampoco con este marcador hay uniformidad en cuanto a la existencia de inervación en la coriocapilar. Así UDDMAN (1980)¹⁴⁰, TERENCEHI (1982)¹³² y UUSITALO (1984)¹⁴², no encuentran fibras VIP(+) a nivel de la coriocapilar; mientras que STONE (1986b,c)^{123,124} las describe en la coriocapilar de diversos animales de experimentación (cobaya, rata, gato y mono) pero no en el hombre. Por último, MILLER (1983)⁸⁵ tampoco las encuentra en la coriocapilar humana, describiendo haces de fibras en la zona subcapilar cerca de la membrana de Bruch, en mayor proporción en la coroides posterior que en la anterior.

Asimismo, varios autores realizan trabajos sobre la inervación coroidea utilizando anticuerpos frente al Neuropéptido Y (NP-Y), sustancia transportada por las fibras nerviosas simpáticas noradrenérgicas. Todos ellos demuestran fibras con inmunorreactividad NP-Y(+) que se sitúan envolviendo a la circulación coroidea formando una red alrededor de los vasos sanguíneos de forma continua, principalmente en las arterias, y también en las venas (TERENGHI, 1982¹³²; BRÜUN, 1984¹³; SUNDLER, 1986¹²⁹; STONE, 1986a)¹²².

También se han utilizado anticuerpos frente a la Sustancia P, neuropéptido transportado por las fibras sensitivas dependientes del V par, demostrando tanto en animales de experimentación como en humanos la presencia de fibras S-P(+)

alrededor de los vasos coroideos en escaso número y principalmente alrededor de los grandes vasos, aunque ocasionalmente en zonas más profundas (SHIMIZU, 1982¹¹²; TERVO, 1982¹³⁶; STONE, 1985¹²¹).

Finalmente, en algunos trabajos, se utilizan marcadores de otros neuropéptidos menos significativos para el estudio de la innervación coroidea. De este modo STONE y LATIES (1983)¹¹⁹, utilizan anticuerpos frente al polipéptido pancreático (péptido similar al NP-Y), transportado por las fibras del origen adrenérgico, demostrando una densidad moderada de fibras nerviosas inmunopositivas rodeando a los vasos coroideos que incluso llegan a alcanzar la coriocapilar. También STONE (1984)¹²⁰, en otro trabajo sobre la innervación ocular utiliza anticuerpos frente al péptido de la colecistoquinina (CCK-8) observando asimismo un modesto número de fibras inmunorreactivas rodeando a los vasos coroideos. Con el anticuerpo frente al péptido codificado por el gen de la calcitonina (CGRP), neuropéptido transportado al igual que la S-P, por fibras trigéminales, se ha demostrado un escaso número de fibras asociadas a los vasos coroideos tanto en ojos humanos como en animales de experimentación; no observándose casi nunca fibras nerviosas en las capas profundas, y nunca en la coriocapilar.

Finalmente, STROMBERG (1987)¹²⁷, STONE (1988)¹²⁶, y GRIMES (1994)⁵¹ demuestran fibras nerviosas inmunorreactivas al péptido galanina que rodean a los

vasos coroideos en escasa proporción. Este neuropéptido, junto con la sustancia P y la CGRP, es transportado por las fibras nerviosas sensitivas dependientes del trigémino en el globo ocular.

En resumen, la totalidad de los trabajos sobre innervación coroidea realizados mediante técnicas inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos frente a neuropéptidos ponen de manifiesto que la innervación coroidea es vascular, como ya habían demostrado previamente los trabajos realizados con impregnaciones metálicas, técnicas histoquímicas y microscopía electrónica; sin llegar a un acuerdo sobre la existencia o no de innervación en la coriocapilar.

Paralelamente a los últimos estudios realizados con anticuerpos frente a neuropéptidos, un número más reducido de autores, emplean anticuerpos frente a los neurofilamentos o filamentos intermedios propios de las neuronas. Así, SEIGER (1983)¹¹⁰, STEPHEN (1987)¹¹⁶ y EPSTEIN (1988)³³, describen una intensa innervación NF(+) que rodea a los vasos sanguíneos coroideos, siendo más intensa alrededor de los vasos de menor tamaño (STEPHEN, 1987)¹¹⁶.

Nosotros, al estudiar los montajes planos de coroides mediante técnicas inmunohistoquímicas, hemos utilizado anticuerpos monoclonales contra estructuras propias de las fibras nerviosas. En primer lugar, anticuerpos frente a la proteína

gliofibrilar ácida (PGFA), para identificar las células de Schwann propias de las fibras amielínicas; y en segundo lugar, anticuerpos frente a los neurofilamentos (NF), componentes del citoesqueleto de los axones de las células nerviosas.

Basándonos en la demostración del esqueleto propio de la fibra nerviosa corioidea, tanto con anti-PGFA como con anti NF de 68, 160 y 200 Kd., coincidimos con todos los trabajos realizados con el resto de las técnicas que la innervación corioidea es de predominio vascular.

En nuestro montajes planos de coroides marcados con estos anticuerpos, hemos observado, en todos los casos, que la señal inmunopositiva se sitúa en toda la extensión de las coroides estudiadas, tanto en los cuadrantes superior, inferior, nasal y temporal. La inmunorreactividad procede de las capas vasculares de los grandes y medianos vasos.

Aunque hay autores previos que consideraron que las fibras nerviosas alcanzaban la coriocapilar (ROSSI, 1936¹⁰¹; MATTEUCCI, 1949⁷⁹; WOLTER, 1960¹⁴⁸; CASTRO-CORREIA, 1961¹⁸; EHINGER, 1966a,b,c,d,e²⁷⁻³¹; MALMFORS, 1965⁷⁸; MATSUSAKA, 1982⁸¹, STONE, 1983¹¹⁹), nosotros en ninguna de nuestras preparaciones marcadas con anti-PGFA y anti-NFs, hemos podido poner de manifiesto fibras nerviosas en la coriocapilar, lo que también es apoyado por otros numerosos autores (BEATIE, 1961³; LATIES, 1974⁶⁵; GUGLIELMONE, 1982⁴⁹; RUSKELL, 1971¹⁰¹; BERGMANSON, 1977⁴; UDDMAN, 1980¹⁴⁰; TERENCEHI,

1982¹³²; UUSITALO, 1984¹⁴²; NUZZI, 1992⁹⁴; FLÜGGEL, 1994a,b^{40,41}).

Todos los vasos estudiados, con excepción de los capilares, presentan una señal inmunopositiva de mayor o menor intensidad, dependiendo del anticuerpo utilizado.

Tras marcar la coroides con anti-PGFA, la señal inmunopositiva perivascular es muy leve [+], incrementándose la señal cuando se emplean anti-NFs, y así con anti NF-68 la señal es ligeramente más intensa [++], con anti NF-160 la inmunorreactividad es mucho más alta [+++], siendo finalmente la señal con anti NF-200 la más intensa de todas [++++].

Esta inmunorreactividad perivascular, independientemente de su intensidad, acompaña en todos los casos a los vasos en todo su recorrido y en todas sus ramificaciones, delimitando por lo tanto el contorno del árbol vascular. Esta señal que rodea al vaso es debido a la presencia de múltiples fibras nerviosas que lo envuelven en toda su trayectoria constituyendo la inervación perivascular.

La inervación que demuestra estas señales perivasculares, en íntima relación con los vasos sanguíneos, también había sido descrita en los primeros trabajos con impregnaciones metálicas por WOLTER (1960)¹⁴⁸, BEATIE (1961)³ y CASTRO-CORREIA (1961,1967)^{18,20}. Nosotros en nuestro trabajo la hemos podido poner también de manifiesto, tanto con la modificación de Liss a la técnica del carbonato

de plata de Del Río Hortega, como con la técnica para neurofibrillas de Cajal.

Asimismo, también había sido demostrada con técnicas histoquímicas para fibras adrenérgicas (EHINGER, 1964²⁶; MALMFORS, 1965⁷⁸; GUGLIELMONE, 1982⁴⁹; NUZZI, 1992⁹⁴); con microscopía electrónica (LYNETTE-FEENEY, 1961a,b^{69,70}; MATSUSAKA, 1982⁸¹); y finalmente con técnicas inmunohistoquímicas con anti-VIP (MILLER, 1983⁸⁵, UUSITALO, 1984¹⁴²; STONE, 1986b,c^{123,124}), anti NP-Y (TERENGI, 1983¹³³; BRÜUN, 1984¹³; SUNDLER, 1986¹²⁹; STONE, 1986a¹²²), y anti S-P (SHIMIZU, 1982¹¹²; TERVO, 1982¹³⁶; STONE, 1985¹²⁵).

A diferencia de todas estas técnicas, en las que las descripciones morfológicas de la innervación perivascular eran difíciles, al ser los anticuerpos específicos de filamentos intermedios propios del esqueleto de la fibra nerviosa, hemos podido estudiar mejor la localización de las fibras, su morfología y distribución.

Asimismo, además de la señal perivascular, encontramos en nuestros montajes coroideos, también con todos los anticuerpos utilizados, otra señal inmunopositiva independiente a la innervación intervacular. Estas fibras independientes son relación íntima con las paredes vasculares ya fueron descritas en el inicio con técnicas de plata por WOLTER (1960)¹⁴⁸ y CASTRO-CORREIA (1967)²⁰. En nuestro trabajo, tanto con la técnica del carbonato de plata modificada por LISS (1956)⁷¹, como con la técnica de neurofibrillas de Cajal (RAMÓN y CAJAL, 1933)⁹⁹, también hemos

podido demostrarlas.

Igualmente apoyamos la observación de estas fibras intervasculares realizada por los autores que estudiaron la inervación coroidea con técnicas histoquímicas (EHINGER, 1964²⁶; MALMFORS, 1965⁷⁸; MATSUSAKA, 1981⁸⁰; GUGLIELMONE, 1982⁴⁹; NUZZI, 1992⁹⁴); con microscopía electrónica (LYNETTE-FEENEY, 1961a,b^{69,70}; RUSKELL, 1971¹⁰⁵; BERGMANSON, 1977⁴); y con diferentes anticuerpos: anti-VIP (MILLER, 1983⁸⁵; UUSITALO, 1984¹⁴²; STONE, 1986b,c^{123,124}), anti NP-Y (BRÜUN, 1984¹³); y mas recientemente con la técnica histoquímica de la NADPH diaforasa (FLÜGEL-KOCH, 1994a,b^{40,41}).

Con los anticuerpos frente a la PGFA, la señal intervascular es más intensa [++] que la perivascular [+]. Se sitúa entre los vasos coroides de mediano y gran tamaño, siendo más fácil de estudiar, con esta técnica, que la inervación perivascular.

Con los anticuerpos frente a NF-68, la señal intervascular también es más intensa [++-] que la perivascular [++]. Sin embargo, comparativamente con ésta, es una señal muy escasa y discontinua, que se observa entre los vasos coroides de forma muy aislada.

Con anti NF-160, la señal intervascular es más fuerte [++++] que la perivascular [+++], aunque como podemos apreciar ambas son muy intensas. Esta señal se localiza en toda la extensión coroidea, y en todas las capas vasculares con excepción de la coriocapilar. La inmunorreactividad intervascular que se obtiene con

anti NF-160, es la mayor señal inmunopositiva entre los vasos demostrada en nuestro trabajo con todos los anticuerpos empleados. Es una señal muy frecuente y muy bien definida, que permite estudiar la localización de las fibras intervasculares con gran perfección. Así, con este anticuerpo hemos podido demostrar varios tipos de fibras intervasculares y su distribución, definiendo claramente su morfología. Las fibras intervasculares, con este anticuerpo, se observan en toda la extensión coroidea, desde la transición con el cuerpo ciliar hasta el polo posterior, y desde la supracoroides hasta la capa de medianos vasos sin interrupción, no encontrándose ninguna fibra en el territorio de la coriocalilar.

Con los anti NF-200, la señal intervascular, es menos intensa [+ + +] que la perivascular [+ + + +]; aunque la reacción tiene la intensidad suficiente para poder localizar perfectamente las fibras nerviosas intervasculares. Con este anticuerpo, estas fibras presentan una menor definición que la obtenida al emplear anti NF-160. Sin embargo, al marcar la coroides con anti NF-200 también se observan fibras intervasculares en toda la extensión coroidea, desde la zona de transición del cuerpo ciliar hasta el polo posterior, y desde la supracoroides hasta la capa de los vasos medianos, volviendo a coincidir en la no existencia de fibras intervasculares en la coriocalilar.

Por lo tanto, y como resumen, podemos afirmar que para el estudio de la inervación intervascular el mejor anticuerpo es el anti NF-160.

Finalmente, al estudiar la innervación de la zona de transición entre la coroides periférica y el cuerpo ciliar, LATIES (1966)⁶⁴, con técnicas histoquímicas, ya observó cómo la innervación adrenérgica en el conejo se extendía hasta la coroides periférica. Posteriormente KIRBY (1978)⁵⁸ describió un grupo de células ganglionares adrenérgicas intensamente fluorescentes en el territorio coroideo adyacente al cuerpo ciliar. Estas neuronas presentaban prolongaciones fluorescentes que formaban un plexo con varicosidades propias de las fibras adrenérgicas, plexo que se interrumpía bruscamente en la unión de la coroides con el cuerpo ciliar.

Mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas, MILLER (1983)⁸⁵ describe cómo los haces nerviosos VIP(+) al llegar al borde anterior de la coroides próximo al cuerpo ciliar, cambian su disposición longitudinal, situándose circunferencialmente, sugiriendo un cambio en la innervación. Así, en el estroma coroideo anterior describe que los haces de fibras VIP(+) forman un plexo varicoso poco denso situado paralelo a los vasos y que se ramifica anastomosándose; de este plexo parten fibras aisladas que se dividen varias veces antes de terminar libremente, lo que ocurre frecuentemente en este área.

Por último, SEIGER (1983)¹¹⁰ utilizando anticuerpos frente a NFs, demuestra en la coroides de rata próxima al cuerpo ciliar, unos haces de axones gruesos no ramificados que son casi las únicas fibras que se observan a este nivel.

En nuestras preparaciones de montajes planos coroideos, hemos encontrado

inervación en la zona de transición con el cuerpo ciliar, solamente cuando empleamos anti-NFs. Con los anticuerpos dirigidos contra los tres tipos de NFs de diferente peso molecular (anti NF-68, NF-160 y NF-200), aparece inmunorreactividad positiva a ese nivel, siendo la intensidad de la señal diferente según el anti-NF utilizado.

Cuando se emplea anti NF-160 y anti NF-200, la señal inmunopositiva es bastante intensa [+++] en la coroides periférica próxima a los procesos ciliares; aunque, sin embargo, la mayor reacción se obtiene con el anti NF-68 [++++]; por lo que podemos considerar a este último anticuerpo como el mejor marcador para el estudio de la innervación de la zona de transición. La señal que se obtiene al utilizar anti NF-68 en la zona de la coroides periférica es, comparativamente, mucho más intensa que las inmunorreacciones peri e intervasculares presentes en la coroides central al utilizar este mismo anticuerpo.

Las fibras nerviosas que demostramos en la zona de transición con los tres anti-NFs, se pueden considerar fibras intervasculares ya que no tienen una relación aparente con las estructuras vasculares. Asimismo, tampoco hemos observado fibras nerviosas en esta zona con las tinciones de plata y al emplear anti-PGFA.

5.2.- MORFOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN DE LAS FIBRAS NERVIOSAS.

Ultraestructuralmente las fibras nerviosas coroides pueden ser de dos tipos dependiendo de la naturaleza de la fibra: fibras mielínicas y amielínicas.

Las fibras mielínicas están rodeadas de una vaina de mielina, mientras que, las amielínicas son desnudas, estando rodeadas por una envoltura de citoplasma de células de Schwann. En la coroides los únicos nervios mielinizados se encuentran a nivel de la supracoroides constituyendo haces gruesos; estos nervios pierden progresivamente su vaina de mielina a medida que penetran en el estroma y se van ramificando para quedarse con una envuelta de citoplasma de células de Schwann (LYNETTE-FEENEY, 1961a,b^{69,70}; RUSKELL, 1971¹⁰⁵; BERGMANSON, 1977⁴).

Debido a la afinidad de las impregnaciones argénticas hacia la mielina, CASTRO-CORREIA (1961)¹⁸, describe fibras mielínicas teñidas fuertemente por la plata, que se sitúan en la supracoroides, y que a medida que van ramificándose y penetrando en el estroma corioideo van perdiendo la vaina de mielina, siendo los núcleos de las células de Schwann evidentes, llegando a observarse el citoplasma de la célula cuando los nervios llegan a ser haces de pocas fibras.

En nuestros montajes planos de coroides, teñidos con técnicas argénticas, hemos observado, coincidiendo con CASTRO-CORREIA (1961)¹⁸, cómo la mayor

parte de las fibras coroideas son amielínicas, situándose las fibras mielínicas solamente en la supracoroides. Con la técnica para neurofibrillas de Cajal demostramos como las fibras mielínicas se reducen intensamente por la plata en la supracoroides, mientras que, en las capas más internas al perder la vaina de mielina se reducen menos lo que nos permite observar los núcleos de las células de Schwann. Esto nos permite afirmar que la mayor parte de las fibras nerviosas coroideas son amielínicas.

Ultraestructuralmente las fibras amielínicas, como ya hemos expuesto, están constituidas por axones rodeados de una envuelta de citoplasma de células de Schwann (HOGAN, 1971⁵⁴). Los anticuerpos contra la proteína GFA se unen a los filamentos de las células de Schwann del S.N.P. (JENSEN, 1984⁵⁶; DAHL, 1982²¹), siendo buenos marcadores de las fibras amielínicas. Por tanto, para el estudio de la morfología y distribución de las fibras nerviosas coroideas hemos utilizado este anticuerpo como marcador.

Como las células de Schwann rodean a los axones en las fibras amielínicas, las inmunodetecciones con anti-PGFA nos van a permitir obtener unas imágenes bastantes semejantes a la morfología de la fibra nerviosa amielínica.

Ultraestructuralmente los neurofilamentos son un tipo de filamentos intermedio muy abundante en los axones, donde se disponen paralelos al eje de los mismos (WUERKER, 1972¹⁵²). En ellos pueden estar dispersos o se pueden disponer en haces que normalmente se extienden sin interrupción en grandes distancias, siendo sólo discontinuos en los nodos de Ranvier (TSUKITA, 1981¹³⁹). De este modo los anticuerpos frente a los NFs son buenos marcadores de las fibras nerviosas, tanto mielínicas como amielínicas, y por este motivo los hemos utilizado, además del anti-PGFA, para completar nuestros estudios sobre la morfología de las fibras nerviosas coroideas.

Debido a la especificidad de los anti-NFs por uno de los componentes más abundantes del citoesqueleto axonal, las imágenes obtenidas con estos anticuerpos son mucho más definidas que las que se obtienen con el resto de las técnicas que hemos empleado en este trabajo.

En los montajes planos coroideos, hemos observado con todas las técnicas, cómo las fibras nerviosas se dividen en dos grandes grupos dependiendo de su situación con respecto a los vasos sanguíneos: fibras perivasculares y fibras intervasculares.

Estos dos sistemas nerviosos coroideos diferentes, pero relacionados e interconectados entre sí fueron demostrados primeramente con las técnicas argénticas

(WOLTER, 1960¹⁴⁸; BEATIE 1961³; CASTRO-CORREIA, 1961¹⁸). Otros trabajos posteriores confirmaron estas observaciones con técnicas histoquímicas (EHINGER, 1964²⁶; MALMFORS, 1965⁷⁸; MATSUSAKA, 1981⁸⁰; GUGLIELMONE, 1982⁴⁹; NUZZI, 1992⁹⁴), con microscopía electrónica (LYNETTE-FEENEY, 1961a,b^{69,70}; RUSKELL, 1971¹⁰⁵; BERGMANSON, 1977⁴), así como con técnicas inmunohistoquímicas empleando anti-VIP, anti NP-Y y NDAPH diaforasa (MILLER, 1983⁸⁵; USITALO, 1984¹⁴²; BRÜUN, 1984¹³; STONE, 1986a,b,c¹²²⁻¹²⁴; FLÜGGEL-KOCK. 1994a,b^{40,41}).

Nosotros estamos de acuerdo con las observaciones iniciales de WOLTER (1960)¹⁴¹⁴⁹ y CASTRO-CORREIA (1961)¹⁸ obtenidas mediante el empleo de técnicas argénticas, demostrando en nuestros montajes planos marcados con estas técnicas, la presencia en la coroides de fibras perivasculares e intervasculares.

Coincidiendo con CASTRO-CORREIA (1967)²⁰ demostramos como las fibras perivasculares proceden en su origen de los troncos de los nervios ciliares posteriores y acompañan a las arterias ciliares cortas posteriores desde la vecindad del nervio óptico hasta su terminación en las venas vorticosas. Estas fibras se ramifican siguiendo la distribución arterial, disminuyendo de tamaño en su progresión tanto postero-anterior como en profundidad.

Como MAWAS (1952)⁸⁴ y CASTRO-CORREIA (1967)²⁰ observamos fibras perivasculares con un patrón espiroideo o helicoidal que rodean a la pared de los vasos arteriales y venosos.

Sin embargo, ninguno de estos autores demuestra con las técnicas de plata las fibras en abanico y las fibras longitudinales que observamos en nuestro trabajo en los vasos de gran calibre; probablemente debido a que son discontinuos pudiendo observarlas solamente en algunas zonas del vaso, presentando asimismo una débil reducción por la plata.

Del mismo modo, coincidiendo con las observaciones de CASTRO-CORREIA (1967)²⁰ demostramos la presencia de fibras intervasculares con las técnicas argénticas. Dentro de este grupo hemos descrito por un lado la presencia de fibras que constituyen plexos, y por otro una serie de fibras independientes. Los plexos de fibras situados en tres niveles ya fueron observados por CASTRO-CORREIA (1967)²⁰ en la capa de los grandes vasos constituido por fibras gruesas, un plexo medio formado por nervios más estrechos situado internamente a la capa de los grandes vasos, y por último un plexo interno formado por nervios con muy pocas fibras que a diferencia de sus observaciones termina en la cara externa de la coriocapilar, nunca observándose fibras dentro de ella en todos nuestros montajes planos.

Además de estos plexos, observamos fibras intervasculares que no constituyen plexos, a las que hemos denominado fibras independientes. Estas fibras tampoco siguen la trayectoria de los vasos pero se relacionan con ellos. Se sitúan fundamentalmente en la supracoroides y en la capa de los grandes vasos; presentan una morfología diversa: helicoidal, en abanico y lanceolada. Ninguna de las tres fibras había sido descrita por CASTRO-CORREIA (1967)²⁰ en sus trabajos con plata como fibras propiamente dichas. Este autor solamente describe en la rata unas terminaciones sensitivas de forma lanceolada, a veces agrupadas en dos, que podrían corresponder a nuestra fibras lanceoladas o con forma de llama.

Tampoco hemos observado otras terminaciones sensitivas descritas por CASTRO-CORREIA²⁰: terminaciones en forma alargada o fusiforme en la que se puede observar una estructura espiral en su interior (en animales de experimentación), y terminaciones que se conectan con una expansión fibrilar terminal de forma triangular (en humanos).

En cuanto a las terminaciones motoras, observadas por BIETTI (1895a,b)^{5,6} y SALZMANN (1912)¹⁰⁶ en sus trabajos con impregnaciones metálicas, como ensanchamientos pequeños y esféricos de las fibras nerviosas terminales en relación con la muscular de los vasos, no hemos podido observarlas en nuestros montajes coroides marcados con técnicas de plata. Asimismo, no hemos podido demostrar las fibras individuales, ramas de fibras perivasculares que llegan a inervar las fibras musculares lisas de las paredes vasculares, en su capa media, descrita por BEATIE (1961)³ y CASTRO-CORREIA (1967)²⁰. Tampoco hemos observado las pequeñas ramas de las fibras perivasculares que según las observaciones de WOLTER (1960)¹⁴⁸ hacen contacto con las células endoteliales y con los pericitos, en las capas más internas de la pared de los vasos, al utilizar nuestras técnicas de plata.

Paralelamente a estos trabajos con impregnaciones metálicas, ultraestructuralmente LYNETTE-FEENEY (1961a,b)^{69,70} no puede demostrar

contactos directos entre los axones y las fibras musculares lisas de la pared de los vasos como postulaban BIETTI (1895a,b)^{5,6}, SALZMANN (1912)¹⁰⁶, BEATIE (1961)³, y CASTRO-CORREIA (1961)¹⁸. Sin embargo, observaron que en ocasiones el axon pierde la cubierta de la célula de Schwann quedando sólo separado de la membrana de la célula muscular lisa por su membrana basal. Aunque, no había un verdadero contacto entre el axon y el sarcolema, sí se encontraban vesículas sinápticas abundantes en el axoplasma de dos tipos: similares a los gránulos neurosecretores de la neurohipófisis y similares a las vesículas sinápticas de las uniones neuromusculares.

Posteriormente HAGGENDAL y MALMFORS (1965)⁵², con técnicas histoquímicas para fibras adrenérgicas, describen fibras terminales finas y con abundantes varicosidades intensamente fluorescentes, que se localizan en el límite entre la adventicia y la capa muscular lisa de la media vascular, que podían corresponder a las terminaciones motoras musculares.

RUSKELL (1971)¹⁰⁵ en sus trabajos ultraestructurales observa que las únicas grandes concentraciones de haces de axones terminales se ven próximos a las células musculares de las arterias, arteriolas, venas y vénulas; se sitúan próximas a la cara externa de la capa muscular y sus axones presentan varicosidades con vesículas que se orientan hacia la capa arteriolar del axón agrupándose.

GUGIELMONE (1982)⁴⁹, también observan a microscopía electrónica, coincidiendo con RUSKELL¹⁰⁵, axones amielínicos aislados o en haces, procedentes de los plexos perivasculares que se sitúan próximos a las capas musculares de los vasos, presentando asimismo varicosidades conteniendo vesículas granulares próximas a la membrana plasmática de la célula muscular: pero además observan axones tanto mielínicos como amielínicos que se sitúan próximos a unas células musculares lisas, de forma estrellada, que forma una extensa red entre las arterias y venas de las capas vasculares coroideas. Estas células son consideradas por NUZZI (1992)⁹⁴ como elementos endocrinos liberadores de catecolaminas en los espacios intervasculares y en la circulación local.

Posteriormente, empleando técnicas inmunohistoquímicas con anti-VIP, TERENCEHI (1982)¹³² observó ultraestructuralmente que este neuropéptido se encuentra en las vesículas grandes y con "core" denso, que presentan las fibras nerviosas varicosas coroideas marcadas con VIP. Demuestra como las terminaciones nerviosas VIP(+) forman pequeños haces alrededor de las arteriolas, existiendo una fuerte asociación entre las fibras nerviosas VIP(+) y las células musculares de las arteriolas coroideas, no pudiendo demostrar uniones neuromusculares.

Finalmente, STEPHEN (1987)¹¹⁶ marcando la coroides con anticuerpos frente a elementos del citoesqueleto neuronal, demuestran ultraestructuralmente una densa red de nervios que hacen sinapsis en pasada en el músculo liso de los vasos

coroideos. Estas ramas nerviosas son axones no mielinizados con densos acúmulos de vesículas, existiendo en ellos unos aparentes sitios de transmisión llenos de vesículas que se sitúan próximos a las membranas musculares; sin embargo, no encontraron ni engrosamientos, ni otra aparente especialización sináptica, ni en el axón ni en la membrana muscular.

A pesar de la gran cantidad de trabajos ultraestructurales que persiguen esclarecer la innervación motora de los vasos coroideos, en ninguno de ellos se realiza un estudio morfológico de las fibras nerviosas coroideas perivasculares. Todos los trabajos ultraestructurales intentan demostrar, como ya hemos expuesto, que las fibras nerviosas terminales inervan o hacen contactos sinápticos con los vasos coroideos, pudiendo por tanto intervenir en la regulación de la vasoconstricción y vasodilatación coroidea.

En nuestros montajes planos coroideos marcados con anticuerpos frente a filamentos intermedios (tanto anti-PGFA, como anti-NFs), hemos tratado de hacer una descripción puramente morfológica de estas fibras nerviosas coroideas perivasculares para completar la información obtenida con estos trabajos ultraestructurales que intentan demostrar la fisiología de estas fibras nerviosas coroideas implicándolas en la regulación del flujo vascular coroideo.

Al observar las coroides marcadas con anti-PGFA o con anti-NFs, podemos

afirmar que la inmunorreactividad perivascular esta determinada por la sumación de señales procedentes de fibras nerviosas perivasculares agrupadas.

Con anti-PGFA esta señal perivascular es muy débil [+] y prácticamente lo único que observamos es la existencia de inmunopositividad rodeando a todos los vasos coroides con excepción de los capilares.

Al emplear anti NF-68 la señal es ligeramente superior [++], aunque tampoco podemos observar algo más que una reacción positiva acompañando a los vasos y que reproduce el patrón del árbol vascular.

Sin embargo, cuando utilizamos anti NF-160, podemos apreciar como los vasos están rodeados de unos fascículos nerviosos acintados que siguen su trayecto en todo su recorrido, y que están formados por múltiples fibrillas individuales que se distinguen claramente al emplear objetivos con aumentos de 40x. Como la señal de cada fibrilla individual es fuerte, la unión de todas las fibrillas produce una señal perivascular bastante intensa [+++], comparativamente con la obtenida con anti-PGFA y anti NF-68.

Finalmente, la inmunorreactividad perivascular observada al marcar las coroides con anti NF-200 es la más fuerte de todas [++++]. Esto es debido, por un lado a la presencia de múltiples fibrillas que rodean a la pared vascular; y por otro a la presencia de múltiples células inmunopositivas de morfología estrellada que al igual que las fibras acompañan a los vasos y sus ramificaciones en todo su recorrido,

constituyendo un verdadero soporte del árbol vascular; estas células son los melanocitos coroideos.

Independientemente de las diferentes intensidades de la inmunoseñal, podemos concluir que las arterias ciliares cortas posteriores están rodeadas de un gran número de fibras nerviosas, que las rodean desde su origen en las proximidades del nervio óptico, hasta su fin en las venas vorticosas, a excepción de la coriocapilar, constituyendo un sistema periarterial; aunque en estas fibras no hemos podido observar fibras terminales, ni terminaciones específicas en relación con las fibras musculares lisas del vaso, como ocurría en los trabajos ultraestructurales.

Hemos podido demostrar con anti NF-200, en las paredes de los grandes vasos, tanto arteriales como venosos, unas fibras muy finas que partiendo de las paredes laterales del vaso, se agrupan y lo rodean a modo de collar. Estas fibras son de calibre muy fino y apariencia discontinua, no pudiéndose demostrar con los otros anti-NFs. Estas fibras perivasculares serían similares a las observadas con anti-PGFA que se agrupan en determinadas zonas de los vasos de mediano calibre con una trayectoria envolvente horizontal, y se encuentran de forma simultanea a las fibras perivasculares responsables de la señal PGFA(+) general de la pared del vaso, presentando una reactividad PGFA(+) superior.

Asimismo, también con anti NF-200, encontramos de forma discontinua y ocasional , unas fibrillas en forma de diapasón que se sitúan cerca de la pared externa de los grandes vasos arteriales y venosos, que no hemos podido demostrar con los restantes anticuerpos.

Además de estudiar la morfología del sistema perivascular, también hemos tratado de conocer la distribución y morfología que presenta el sistema intervacular al ser marcado con técnicas inmunohistoquímicas.

Con todos los anticuerpos empleados (anti-PGFA y anti-NFs) ponemos de manifiesto la existencia de fibras intervacuulares en todas las coroides estudiadas.

Como ya demostró GUGLIELMONE (1982)⁴⁹ en la coroides de gallina con técnicas histoquímicas para fibras adrenérgicas; en nuestro estudio inmunohistoquímico, hemos podido poner de manifiesto la presencia de plexos de fibras intervacuulares, que estarían formados por las ramas coroideas de los nervios ciliares largos y de los nervios ciliares cortos.

Así, los nervios ciliares largos a medida que corren en su progresión hacia el ecuador del globo dan en la supracoroides una o varias ramas que penetran en el tejido corioideo y que se dividen a nivel de las capas vasculares. Por otro lado, los nervios ciliares cortos que penetran en el globo ocular acompañando a las arterias ciliares cortas posteriores, además de formar los plexos perivacuulares ya descritos,

se dividen en pequeños haces nerviosos que se sitúan paralelos u oblicuos a las ramas de las arterias ciliares cortas formando un sistema paraarterial. Los haces más delgados de estas ramas se dividen en el estroma de las capas vasculares y sus ramas finales forman parte de los plexos intervasculares, junto con un pequeño número de fibras procedentes también del plexo perivascular.

Aunque hemos podido demostrar fibras intervasculares con anti-PGFA, estas fibras poseen una señal bastante débil [++] si la comparamos con la inmunorreacción obtenida al emplear anti-NFs. Por ello, con este anticuerpo (anti-PGFA) hemos observado escasas fibras intervasculares que se sitúan entre los vasos y hacen contacto en ocasiones con la pared de los mismos. Son tan escasas que no hemos podido demostrar plexos propiamente dichos, situándose de forma independiente entre los vasos y ramificándose, pudiendo sus ramas aproximarse a la pared de los vasos sin presentar una morfología especial. En ocasiones se abren en abanico en la proximidad del vaso proyectándose en paralelo sobre su pared, imagen que recuerda a las fibras intervasculares que llamábamos en abanico que se observaban en las preparaciones coroideas teñidas con plata.

Sin embargo, utilizando anticuerpos frente a los NFs de 68, 160 y 200 Kd, hemos podido estudiar perfectamente las fibras intervasculares, aunque con variaciones de unos anti-NFs a otros. De este modo con los tres anti-NFs hemos podido demostrar la presencia de los nervios ciliares largos en la supracoroides. Estos

nervios aparecen como fascículos gruesos constituidos por un gran número de fibras (de 70 a 100), con una morfología acintada, próximos a los grandes vasos , y de forma aislada e interrumpida. Creemos que la interrupción que presentan estos fascículos se debe a la fragmentación producida al realizar la disección de la coroides, en el momento en el que se procede a separar esta capa de la esclerótica a la que se encuentra fuertemente unida.

Asimismo, estos nervios presentan la misma morfología y distribución cuando se ponen de manifiesto con los tres anti-NFs, variando únicamente la intensidad de la reacción positiva, de tal forma que la señal menos intensa se obtiene con anti NF-68 [++-], la más intensa con anti NF-160[++++], siendo la del anti NF-200 intermedia [+++].

Disminuyendo de tamaño, hemos observado otros fascículos mas finos constituidos por un número aproximado de 10 fibras, con una morfología también acintada, que se sitúan en la capa de los grandes vasos. Aunque se encuentran próximos a los fragmentos de los nervios ciliares largos nunca hemos observado que deriven directamente de ellos, aunque probablemente sean las ramas coroides de estos nervios. Estos fascículos acintados se ponen de manifiesto con anti NF-160 y anti NF-200, siendo con el primero de ellos la señal mucho más definida. Sin embargo, no se marcan cuando empleamos anti NF-68. En ocasiones estos fascículos siguen un trayecto paralelo a la superficie de un gran vaso, formando un sistema

paraarterial distinto al perivascular. Este sistema paraarterial había sido descrito por BEATIE (1961)³ en el conejo con azul de metileno, por GUGLIELMONE (1982)⁴⁹ en la gallina mediante técnicas histoquímicas, confirmándolo NUZZI (1992)⁹⁴ con esa última técnica. En coroides humanas ha sido descrito por MILLER (1983)⁸⁵ con anti-VIP, y recientemente por FLÜGGEL (1994a,b^{40,41}) con la técnica de la NADPH diaforasa en el conejo.

Estos fascículos nerviosos de aproximadamente 10 fibras, tanto los intervasculares como los paravasculares, se van ramificando en otros de menor cantidad de fibras y menor calibre, dando finalmente fibras de calibre estremadamente fino que llegan a contactar con la pared del vasos sin adoptar ninguna configuración especial.

Estas ramas hijas de los nervios ciliares largos que forman las fibras intervasculares, y de los nervios ciliares cortos que constituyen el sistema paraarterial, son puestas de manifiesto tanto con anti NF-160 como con anti NF-200, no marcándose al igual que las ramas iniciales cuando se emplea anti NF-68.

Aunque estas ramas hijas, de ambos sistemas, llegan a contactar con las paredes vasculares, no hemos observado conexiones entre las fibras inter y paravasculares, ni entre éstas y las perivasculares, a diferencia de lo expuesto por MILLER (1983)⁸⁵ quién describe en coroides humanas marcadas con anti-VIP, como las ramas de los nervios ciliares se unen tanto a los nervios paravasculares como a

los perivasculares.

Sin embargo, las fibras intervasculares que presentan la señal inmunopostiva más intensa de todas, solamente se pueden observar con anti NF-160. Estas fibras presentan una distribución ecuatorial apareciendo de forma aislada e independiente a lo largo de la supracoroides. La elevada tinción de la fibra produce una imagen tan compacta que no permite visualizar las estructuras que van por su interior; únicamente se observan ensanchamientos de forma periódica a lo largo de su trayecto. Este tipo de fascículo nervioso no había sido descrito anteriormente por ningún autor.

Asimismo, tampoco habían sido descritos otros tipos de fibras intervasculares que nosotros demostramos con los tres anti-NFs. Las hemos denominado fibras de largo recorrido, debido a las largas distancias que recorren. Aunque este tipo de fibra intervascular se observa con los tres anti-NFs, las imágenes que se obtienen con ellos son muy distintas.

Utilizando anti NF-68 no podemos seguir el recorrido completo de estas fibras, presentando por tanto una apariencia discontinua. Así, las fibras aparecen en la coroides periférica y desde allí recorren la coroides longitudinalmente hacia el polo posterior. Aunque la señal es bastante intensa [++], desaparecen en algunos tramos; discontinuidad que ya fue observada por SEIGER (1983¹¹⁰) al describir la inervación

coroidea empleando anticuerpos frente a un elemento inespecífico del citoesqueleto neuronal. Al igual que los anticuerpos utilizados por este autor, pensamos que el anti NF-68 no sirve como marcador de estas fibras de largo recorrido; sin embargo en los tramos donde se observa la fibra, hemos podido demostrar que son de naturaleza doble, existiendo al lado de una fibra de calibre grueso otra de grosor más fino.

Con anti NF-200 las fibras de largo recorrido presentan una señal superior [+ + +] a la obtenida con anti NF-68 [+ + -], lo que nos permite seguir la trayectoria de la fibra, desde su origen en la coroides periférica hasta su desaparición. Estas fibras nacen de los fascículos nerviosos que se encuentran en la zona de transición entre la coroides y el cuerpo ciliar, presentando un trayecto bastante largo, aunque no podemos seguirlas hasta el polo posterior porque llega un punto en el que desaparecen. Sin embargo, este trayecto es mucho más largo si se compara con el que se puede obtener al marcar estas fibras con anti NF-68; y contrariamente a lo que se observa con este último anticuerpo (anti NF-68), con el anti NF-200 no se pone de manifiesto la naturaleza doble de estas fibras; apareciendo como fibras individuales que se ramifican ampliamente y que realizan múltiples contactos con la pared de los vasos y con las fibras de largo recorrido vecinas.

Como ya hemos señalado al explicar la localización de las fibras nerviosas coroides, el anti NF-160 es el mejor marcador para poner de manifiesto las fibras intervasculares. Así, al marcar las coroides con él, se puede estudiar con gran detalle

la morfología de estas fibras nerviosas de largo recorrido. Estas fibras presentan una inmunorreacción más intensa [++++] frente al anti NF-160 que la obtenida con anti NF-200 [+++] y con anti NF-68 [++-]. Cuando se marcan con anti NF-160 se puede seguir todo su trayecto, desde su origen en la zona de transición cilio-coroidea hasta la coroides posterior sin que aparezca interrumpida en algún tramo. No obstante, no todas las fibras marcadas llegan hasta el polo posterior; algunas aparecen como fibras individuales que nacen de los plexos de la zona de transición y que como fibras individuales penetran en la coroides sin formar plexos, donde presentan un largo recorrido ramificándose hasta desaparecer; en cambio otras fibras, que son las más numerosas, penetran en la coroides no como fibras individuales sino formando fascículos de aproximadamente 10-15 fibras, que una vez que realizan un pequeño recorrido intracoroideo comienzan a ramificarse, siendo estas ramas las que pueden visualizarse en todo momento sin que desaparezcan (lo que sucedía al marcar con anti NF-68 y anti NF-200).

Todas ellas presentan una señal inmunopositiva muy intensa [++++] y a medida que van recorriendo la coroides en sentido antero-posterior se van incorporando a otras ramas de largo recorrido vecinas. De esta forma, estos fascículos nerviosos pueden ser dobles, triples o múltiples dependiendo del número de fibras que vayan juntas en un determinado tramo de su recorrido.

Casi siempre al lado de una fibra de calibre fino se observa otra paralela de mayor grosor y señal inmunopositiva más intensa. Asimismo, estas fibras sufren ensanchamientos a modo de varicosidades, en tramos intermitentes de su trayecto. Estas varicosidades pueden corresponderse a las observadas por MILLER (1983)⁸⁵ en las fibras nerviosas VIP(+); este autor observó como en una corta longitud una fibra inmunorreactiva tenía grandes varicosidades así como algunas fibras terminales. Sin embargo, no podemos decir que a lo largo de toda la coroides la población de fibras presente varicosidades de un modo homogéneo como han afirmado varios autores al emplear la histoquímica (EHINGER, 1964²⁶; HAGGENDAL, 1965⁵²; KIRBY, 1978⁵⁸; FUKUDA, 1979⁴⁴; MATSUSAKA, 1981⁸⁰; GUGLIELMONE, 1982⁴⁹; NUZZI, 1992⁹⁴).

Por último, hemos observado que la inervación de la zona de transición entre la coroides periférica y el cuerpo ciliar, también presenta diferencias según el anticuerpo empleado.

Al marcar la coroides con anti NF-68 la señal que obtenemos en esta zona de transición es la más intensa [++++] que se obtiene con este anticuerpo, comparativamente con la señal en la coroides central, tanto perivascular [++] como intervacular [+-]. De la misma forma, es una señal también superior a la que se obtiene en la misma forma con anti NF-160 y anti NF-200; por lo que podemos

afirmar que el anti NF-68 es el marcador idóneo para estudiar la innervación en la zona cilio-coroidea.

SEIGER (1982)¹¹⁰ describe en la coroides periférica de la rata, haces de axones gruesos no ramificados a este nivel; posteriormente MILLER (1983)⁸⁵ observó como los haces nerviosos, al llegar al borde anterior de la coroides próxima al cuerpo ciliar, cambian su disposición longitudinal y se sitúan circunferencialmente. Nosotros, al emplear anti NF-68, también encontramos un fascículo nervioso grueso de morfología acintada que penetra en la zona de transición cilio-coroidea recorriéndola circunferencialmente. Este fascículo que presentan una señal intensamente positiva [++++] esta formado por la unión de múltiples fibrillas, y correspondería a un nervio ciliar largo que penetraría a este nivel. Su morfología es muy similar a los fragmentos de nervio ciliar que observábamos en la supracoroides con los tres anti-NFs; pero sin embargo con anti NF-160 y anti NF-200 no se ha podido poner de manifiesto estos fascículos gruesos cilio-coroideos.

De estos nervios ciliares largos que recorren circunferencialmente el cuerpo ciliar, parten múltiples fibras que se ramifican muy abundantemente entre los procesos ciliares, constituyendo auténticos plexos. Algunas ramas de estos plexos penetran en la coroides, siendo de calibre fino y fuerte reacción positiva [++++] por lo que están muy bien definidas, sin que hallamos podido apreciar la existencia de varicosidades en ellas a diferencia de lo descrito por MILLER (1983)⁸⁵

Asimismo, al marcar la inervación cilio-coroidea con anti NF-160 y anti NF-200, aparecen plexos de fibras nerviosas a este nivel; sin embargo, no hemos podido poner de manifiesto estos grandes fascículos de disposición circunferencial. Con estos dos últimos anticuerpos, aparecen fascículos nerviosos de aproximadamente 10 fibras con reactividad intensa [+++] pero menor a la que presentan frente al anti NF-68 [++++]. Estos fascículos se ramifican en otros, también de morfología acintada, que contienen aproximadamente la mitad de fibras y que acaban dando fibras hijas con un largo recorrido intracoroideo, que corresponden a las fibras intervasculares de largo recorrido previamente descritas. Tampoco hemos podido observar que presenten las varicosidades descritas por MILLER (1983)⁸⁵, y también contrariamente a lo descrito por este autor, todas estas fibras puestas de manifiesto con los tres anti-NFs no presentan ninguna relación con el sistema vascular, pudiendo ser consideradas como fibras intervasculares.

5.3.- MORFOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS RELACIONADAS CON LAS FIBRAS NERVIOSAS COROIDEAS.

5.3.1.- CÉLULAS GANGLIONARES.

Desde que SALZMANN (1912)¹⁰⁶ describiera en la coroides la presencia de grandes células ganglionares multipolares con técnicas de plata, son múltiples los autores que las han demostrado en esta capa.

En los primeros trabajos sobre inervación coroidea, realizados con impregnaciones argénticas a finales del siglo pasado y principios de este, existía una gran controversia sobre su existencia.

Así, EHINGER (1964)²⁶, ROSSI (1936)¹⁰¹, MATTEUCCI (1949)⁷⁹, STÖHR (1957)¹¹⁸ y BEATIE (1961)³ niegan su existencia, considerando que las células observadas por SALZMANN¹⁰⁶ serían en realidad melanóforos, células conectivas o en todo caso producto de una emigración esporádica de células desde el ganglio cervical superior o desde el ganglio oftálmico (MATTEUCCI, 1949⁷⁹).

Sin embargo, estas células ganglionares son encontradas por otros autores en diferentes localizaciones: en la supracoroides (MAWAS, 1936⁸³), entre la ora serrata y el espolón escleral (KURUS, 1955⁶¹), y en las capas coroides más internas

rodeadas por melanocitos (WOLTER, 1955¹⁴⁷). Posteriormente, CASTRO-CORREIA (1961)¹⁸ confirma la existencia de las células ganglionares en la coroides, tanto en humanos como en los animales de experimentación. En humanos estas células eran multipolares, mientras que en los animales de experimentación era uni o bipolares; tenían neurofibrillas en su citoplasma, núcleo claro y nucléolo redondo visible, pudiéndose presentar aisladas o en grupo a lo largo de todo el estroma conjuntivo corioideo en la vecindad de los vasos sanguíneos.

En nuestras preparaciones teñidas con técnicas argénticas, tanto con la técnica de Liss como con el método de Cajal, hemos observado la presencia de las células ganglionares. Estas células son bipolares y se sitúan en la proximidad de los grandes vasos, presentando un cuerpo celular globoso del que parten las dos prolongaciones, que a su vez en ocasiones se dividen dirigiéndose sus ramas hacia las paredes vasculares. Como se tiñen intensamente por la plata no hemos podido visualizar ni su núcleo ni su nucléolo.

Aunque se sitúan próximas a los plexos de fibras intervasculares tampoco hemos observado conexiones directas entre estas células y las fibras nerviosas. Sin embargo, ultraestructuralmente, LYNETTE-FEENEY (1961a,b)^{69,70} demostró la presencia de numerosas fibras nerviosas periféricas que estaban en íntimo contacto con las células ganglionares, produciendo frecuentemente profundas indentaciones en

su membrana plasmática. La fibra podía estar separada de la célula ganglionar, o por una delgada capa de citoplasma de célula de Schwann, o por un espacio intercelular y sus respectivas membranas plasmáticas, siendo este último contacto el más directo según este autor. Posteriormente, BERGMANSON (1977)⁴, confirmó estas observaciones ultraestructurales sobre la existencia de las células ganglionares y sus sinapsis motoras.

Asimismo, KIRBY y MATTIO (1978)⁵⁸ describen en la gallina, con histoquímica para fibras adrenérgicas, un grupo de células ganglionares intensamente fluorescentes en la coroides periférica adyacente al cuerpo ciliar. Estas células son multipolares y sus prolongaciones forman parte de un plexo en el interior de la coroides, presentando múltiples varicosidades propias de los nervios adrenérgicos; postulando estos autores que estas células representarían un ganglio terminal sináptico. Estos hallazgos, son confirmados con esa misma técnica, y en el mismo animal, por GUGLIELMONE (1982)⁴⁹, al encontrar pequeñas neuronas fluorescentes aisladas o en grupos, con la misma localización en los sectores coroides anteriores y formando parte de los plexos intervasculares. Por contra, NUZZI (1992)⁹⁴ no pudo demostrar la existencia de las células ganglionares al emplear esta técnica en coroides humanas.

Posteriormente, con técnicas inmunohistoquímicas, TERENGHI (1982)¹³² describe en la coroides del conejo células ganglionares acetil-colinesterasa y dopamina- β -hidroxiladas inmunopositivas; ambas de forma aislado o en grupos, y sin que presenten una localización preferencial.

Sin embargo, TERENGHI¹³² no observa que estas células presenten inmunorreactividad frente al anti-VIP, contrariamente a lo observado en ese mismo año por MILLER (1983)⁸⁵, quien describe como en la coroides humana aparecen cuerpos celulares ganglionares VIP(+) aislados o en grupos, en un número aproximado de 10 por cada coroides estudiada; estas células eran generalmente bipolares, fusiformes, con el núcleo no inmunorreactivo. También observó alguna célula unipolar o multipolar al igual que CASTRO-CORREIA (1967)²⁰ en humanos.

Posteriormente SEIGER (1983)¹¹⁰ marcando la coroides con anticuerpos frente a un elemento inespecífico del citoesqueleto neuronal no pudo poner de manifiesto células ganglionares en la coroides de varios animales de experimentación.

Nosotros, al estudiar la coroides de conejo marcándola con anti NF-68, tampoco podemos poner de manifiesto las células ganglionares; células que sin embargo, si se observan cuando empleamos anti NF-160 y anti NF-200. Con estos dos últimos anticuerpos se aprecia como las células ganglionares se localizan en la región anterior de la coroides próximas a la zona de transición con el cuerpo ciliar, coincidiendo con las observaciones de KIRBY (1978)⁵⁸ y GUGLIELMONE (1982)⁴⁹.

En las preparaciones marcadas con anti NF-160, las células ganglionares son bipolares, presentando las mismas características ya descritas por MILLER (1983)⁸⁵ en la coroides humana: cuerpo fusiforme y núcleo inmunonegativo. Estas células son muy escasas y se encuentran formando parte de los plexos de fibras intervasculares como demostró GUGLIELMONE (1982)⁴⁹ en la gallina. Poseen una señal bastante intensa [+++] frente a este anticuerpo y se pueden encontrar en grupos de 2-3 células pero también aisladas.

En cambio, en las coroides marcadas con anti NF-200, las células ganglionares aparecen con una morfología multipolar y cuerpo triangular inmunopositivo con núcleo NF-200(-), con tres o cuatro prolongaciones partiendo de su soma con una señal [+++] similar a la obtenida con anti NF-160. También hemos encontrado en algunas ocasiones células bipolares NF-200(+) similares a las descritas con anti NF-160 y técnicas de plata.

Finalmente, FLÜGEL-KOCH (1994a,b^{40,41}) además de demostrar células ganglionares NADPH(+) en la coroides periférica del conejo, similares a las descritas en nuestro trabajo con anti NF-160 y NF-200, describe que la mayor parte de las células en la coroides de esta especie, se sitúan adyacentes a las arterias ciliares largas posteriores y presentan una morfología redondeada u oval distinta a la fusiforme o triangular demostrada en nuestros trabajos.

No hemos podido poner de manifiesto que existan diferencias regionales con respecto a la distribución de las células ganglionares como indica FLÜGEL-KOCH^{40,41} en el ojo humano. Este autor demuestra con la técnica de la NADPH-diaforasa, que el mayor número de células ganglionares, a la vez que las más grandes, se encuentra próximo a la fóvea; mientras que, el número de células va disminuyendo así como su tamaño en dirección hacia la periferia. Estas células subfoveales son mayores en los individuos de mayor edad al existir un mayor acumulo de lipofusquina. Como nuestro animal de experimentación, el conejo, carece de fóvea (NICKEL, 1992)⁹⁰, es posible que por ello ni FLÜGEL-KOCH^{40,41}, con NADPH-diaforasa) ni nosotros (con anti NF-160 y anti NF-200), hayamos podido demostrar células ganglionares en el polo posterior de la coroides.

Estas neuronas de la zona subfovea serían en el hombre las responsables de la regulación del reflejo vasodilatador rápido, tan importante en la fovea.

De igual forma, el envejecimiento neuronal, demostrado por el incremento de lipofusquina en el citoplasma con el consiguiente aumento del tamaño celular, fue demostrado también en la región central corioidea (subfoveal), siendo un indicador del posible papel de la luz en el envejecimiento neuronal subfoveal.

También FLÜGEL-KOCH, en sus trabajos de 1994^{40,41}, demuestra que las células ganglionares corioideas humanas son oxido nitroso-sintetasa (ONS) positivas.

La ONS es una enzima que se encuentra en las neuronas que contienen VIP en el S.N.P. (KUMMER, 1992⁶⁰), y las células ganglionares ONS inmunopositivas estarían utilizando el óxido nítrico como neurotransmisor. Este óxido nítrico está implicado en la vasodilatación a través de la regulación de la fibra muscular lisa vascular, por tanto, la presencia en la coroides humana, tanto de neuronas VIP(+) (MILLER, 1983⁸⁵; FLÜGEL-KOCH, 1994a,b^{40,41}) como ONS(+) (FLÜGEL-KOCH, 1994a,b^{40,41}), podría indicar que estas células estarían implicadas en la regulación de los incrementos del flujo corioideo bajo determinadas condiciones adversas, como puede ser la existencia de gran luminosidad o una disminución de la presión arterial, situaciones que precisan una respuesta vasodilatadora rápida en la coroides.

5.3.2.- MELANOCITOS.

Desde que WOLTER en 1955¹⁴⁷ describiese en la coroides humana, con técnicas de plata, la existencia de una relación muy marcada entre los melanocitos y los nervios corioideos, han sido múltiples los trabajos que han intentado demostrar y confirmar esta relación

Así, WOLTER (1960)¹⁴⁸, vuelve de nuevo a describir la presencia de fibras en las proximidades de los melanocitos, pero sin poder afirmar ni poner de manifiesto una innervación específica de los mismos. Sin embargo, ultraestructuralmente, LYNETTE-FEENEY (1961a,b)^{69,70}, encuentra una estrecha asociación de las fibras nerviosas con los melanocitos, en todas las capas coroideas; al observar cómo estas células se sitúan a lo largo de un haz nervioso o rodeando sus prolongaciones, así como en los puntos nodales de los plexos. El melanocito se encuentra separado de las fibras nerviosas por las membranas basales de ambos elementos y por una capa de citoplasma perteneciente a una célula de Schwann; sólo en una ocasión se pudo demostrar un auténtico contacto, al observarse como el melanocito y la fibra nerviosa únicamente se encontraban separados por sus respectivas membranas. Posteriormente, CASTRO-CORREIA (1967)²⁰, apoya las observaciones de LYNETTE-FEENEY^{69,70}, al describir como hay fibras nerviosas que contactan con los melanocitos. En algunas ocasiones estas fibras terminan en forma esferular, pero en otros casos no presentan ninguna configuración terminal específica al alcanzar el melanocito.

En nuestro trabajo, con las técnicas de plata, podemos demostrar la presencia de los melanocitos en todas las capas coroideas, aunque la mayor proporción de ellos se localice en la supracoroides. Todos ellos se encuentran próximos a fibras nerviosas peri e intervasculares, acercándose en ocasiones mucho a las mismas; pero, sin embargo, no hemos podido observar contactos directos entre ellos.

LATIES (1974)⁶⁵ al aplicar el método de la fluorescencia no puede demostrar que exista una innervación adrenérgica específica de los melanocitos coroideos; aunque si que puso de manifiesto evidencias de innervación adrenérgica durante el desarrollo, al demostrar que la actividad de la enzima tirosinasa, necesaria para la síntesis de melanina, disminuye drásticamente tras la denervación simpática de este tejido.

MATSUSAKA (1982)⁸¹ demuestra ultraestructuralmente como ramificaciones de los nervios ciliares realizan verdaderos contactos con los melanocitos, siendo algunos de ellos de naturaleza sináptica, al existir un interespacio axón-melanocito de 30-70 nm de ancho presentando el axoplasma vesículas sinápticas. Estas terminaciones nerviosas sobre los melanocitos fueron observadas cerca y dentro de la coriocapilar, postulando la teoría de que los melanocitos podrían formar una red de soporte para los capilares de dicha capa, siendo controlada esta función por los nervios ciliares.

Posteriormente, STONE, utilizando anticuerpos frente a diversos neuropéptidos: anti-VIP y anti NP-Y (1986a,b,c¹²²⁻¹²⁴), anti-SP (1985)¹²¹ y anti-CGRP (1988a)¹²⁵; demuestra una fuerte asociación entre las fibras inmunopositivas a estos anticuerpos y los melanocitos coroideos, pero siempre de forma ocasional.

En nuestras preparaciones marcadas con los diferentes anticuerpos (anti-PGFA, anti NF-68, anti NF-160 y anti NF-200) únicamente hemos podido visualizar los melanocitos coroides al utilizar anticuerpos contra el neurofilamento de mayor peso molecular (NF-200). A pesar de que los neurofilamentos son los filamentos intermedios propios del citoesqueleto neuronal (LAZARIDES, 1980⁶⁶), creemos que los NF-200 y los filamentos intermedios presentes en el citoesqueleto de los melanocitos podrían tener determinantes antigénicos comunes, lo que permitiría marcar a estas células con anticuerpos frente al neuropéptido de mayor peso molecular.

Esta hipótesis, se puede apoyar, por un lado en el origen común neuroectodérmico de las células nerviosas y los melanocitos, lo que posibilitaría la existencia de semejanzas estructurales en el citoesqueleto de ambas extirpes celulares; y por otro lado, se ha demostrado que el NF de 200 kd es el último neurofilamento en aparecer durante el desarrollo embrionario y filogenético (BATES, 1993²) encontrándose en el citoplasma axonal una vez que el axon ya está maduro, pudiendo ser considerado como la proteína encargada de estabilizar al axon cuando este es maduro (BATES, 1993)². Además, este neurofilamento, el NF-200, se incrementa en los procesos de regeneración axonal apareciendo en los períodos más precoces del crecimiento axonal, siendo estimulado en esta situación por la α -melanotropina (α -MSH) (VADOUD-SEYEDI, 1994¹⁴⁹), que es una proteína sintetizada por la glándula

pituitaria, que produce a su vez múltiples efectos en los melanocitos (WEATHERHEAD, 1988¹⁵¹). Esta influencia común de la α -MSH en los melanocitos y en los NF-200 podría ser un apoyo más para la hipótesis inicial de la existencia de algún determinante antigénico común entre los filamentos intermedios de ambos elementos.

Los melanocitos coroideos puestos de manifiesto al emplear anti NF-200 se encuentran en toda la extensión coroidea, coincidiendo con las observaciones ultraestructurales de otros autores (LYNETTE-FEENEY, 1961a,b^{69,70}; BERGMANSON, 1977)⁴; situándose principalmente alrededor de los vasos de mediano y gran tamaño, a los que rodean a lo largo de su recorrido. Aunque no se han observado conexiones entre melanocitos próximos, la disposición de estas células parece indicar que forman una red tridimensional que soporta los vasos sanguíneos; función que coincidiría con la teoría de MATSUSAKA (1982)⁸¹ sobre el soporte de la coriocapilar, aunque sin embargo, nosotros no hayamos podido demostrar la existencia de melanocitos en esta capa.

Por otra parte, las fibras nerviosas NF-200(+), inter y perivasculares, se encuentran muy próximas a los melanocitos, como ocurría cuando se demostraban con otros neuropéptidos (STONE, 1985,1986a,,b,c,1988a¹²¹⁻¹²⁵). En ocasiones se aproximan tanto a los melanocitos que parece que realizan contactos con los mismos,

aunque con esta técnica y a microscopía óptica, no podamos demostrar la existencia de estos contactos directos previamente demostrados ultraestructuralmente (LYNETTE-FEENEY, 1961a,b^{69,70}; BERGMANSON, 1977⁴, MATSUSAKA, 1982⁸¹).

Por último, y para concluir, tampoco hemos podido poner de manifiesto los puntos sinápticos descritos por NUZZI (1992)⁹⁴ entre las fibras nerviosas intervasculares y los melanocitos.

6.- CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES.

- I.- Con las impregnaciones argénticas confirmamos la existencia en la coroides de dos grandes grupos de fibras nerviosas: fibras mielínicas y amielínicas; así como la presencia de dos subgrupos principales dentro de estas últimas dependiendo de su relación con los vasos sanguíneos: las fibras perivasculares y las intervasculares.

- II.- En toda la extensión coroidea se encuentra inmunorreactividad positiva, tanto frente a los anticuerpos contra PGFA, como con los anti NF-68, NF-160 y NF-200, variando únicamente la intensidad de la señal. Estas señales se localizan fundamentalmente en relación con las paredes vasculares, a nivel de la capa de grandes y medianos vasos, estando ausente, sin embargo, en la coriocapilar; confirmando que la inervación coroidea es de predominio vascular.

- III.- En la zona de transición cilio-coroidea se observa una gran inmunorreactividad frente al anti NF-68. Siendo esta señal más débil con los anti-NF de 160 y 200, no encontrándose con el anti-PGFA. Por lo tanto, el anti NF-68 sería el mejor marcador para el estudio de las fibras nerviosas de esta zona.

- IV.- Con todos los anticuerpos empleados se observa inmunorreactividad positiva alrededor de los grandes y medianos vasos coroideos, tanto arteriales como venosos; siendo esta señal la suma de las señales correspondientes a fibrillas individuales que se disponen acompañando y rodeando a los vasos sanguíneos durante todo su trayecto.
- V.- Con el anti NF-160 las fibras perivasculares se demuestran como fascículos acintados que rodean a los vasos en todo su recorrido. En las paredes de los grandes vasos, también con este anticuerpo, se demuestra la existencia de unas fibras discontinuas con forma similar a un diapasón.
- VI.- Utilizando los anticuerpos frente a los neurofilamentos de 68, 160 y 200, es posible marcar los nervios ciliares en la supracoroides, presentando estos una morfología acintada. Tras sucesivas ramificaciones los nervios ciliares se introducen en la capa de los grandes y medianos vasos llegando a contactar con las paredes vasculares.
- VII.- Con el anti NF-160 se ponen de manifiesto fibras intensamente inmunopositivas situadas en la supracoroides que presentan dilataciones periódicas de las que parten fibrillas.

- VIII.- Todos los anticuerpos frente a los NFs de distinto peso molecular, demuestran la existencia de fibras nerviosas de largo recorrido a través de la coroides; siendo, no obstante, el más selectivo para su marcaje el anti NF-160. Este anticuerpo muestra fibras de naturaleza múltiple en las que habitualmente aparece un filamento grueso acompañado de otro fino.
- IX.- El anticuerpo frente al NF-160 es el mejor marcador para el estudio de las fibras nerviosas coroides, tanto peri como intervasculares.
- X.- Tanto con las impregnaciones argénticas como con las técnicas inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos contra los NFs de 160 y 200 Kd. demostramos la existencia de células ganglionares en la coroides periférica. Estas células presentan habitualmente una morfología bipolar, núcleo inmunonegativo, así como dos prolongaciones a cada lado que forman parte de las fibras intervasculares. Asimismo, en ocasiones, estas células pueden presentar morfología multipolar.
- XI.- Con el anti NF-160, se pone de manifiesto la existencia de células ganglionares, tanto para los filamentos finos como para los filamentos gruesos de las fibras intervasculares de largo recorrido.

- XII.- Los melanocitos coroides se tiñen tanto con las técnicas de plata como con los anticuerpos frente a los NF-200. Estas células tienen forma estrellada, se unen por sus prolongaciones para formar una red, y se sitúan próximos a las paredes de los medianos y pequeños vasos, así como en el estroma corioideo.
- XIII.- Con el anti NF-200, hemos podido marcar fibras nerviosas coroides que se sitúan muy próximas a los melanocitos, aunque no se ha podido demostrar la existencia de un verdadero contacto; no obstante, el anticuerpo contra el NF-200 sería el mejor marcador para el estudio de las relaciones de las fibras nerviosas con los melanocitos.

7.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- ALVAREZ, M.P., SOLAS, M.T., SUÁREZ, I., FERNÁNDEZ, B. (1989): *"Glial fibrillary acidic protein-like immunoreactivity in cat satellite cells of sympathetic ganglia"*. Acta Anatomica, 136: 9-11
- 2.- BATES, C.A., MEYER, R.L. (1993): *"The heavy neurofilament protein is expressed in regenerating adult but not embryonic mammalian optic fibers in vitro"*. Experimental Neurology, 119: 249-257.
- 3.- BEATIE, J.C., STILWELL, D.L. (1961): *"Innervation of the eye."* Anatomical Record, 141: 45-62.
- 4.- BERGMANSON, J.P.G. (1977): *"The ophthalmic innervation of the uvea in monkeys"*. Experimental Eye Research, 24: 225-240
- 5.- BIETTI, A. (1895a): *"Sulla distribuzione e terminazione delle fibre nervose nella corioidea (nota preventiva)." Annali di Oftalmologia, 24: 233.*
- 6.- BIETTI, A. (1895b): *"Sulla distribuzione e terminazione delle fibre nervose nella corioidea"*. Bolletino della Società Medico-Chirurgica di Pavia, 174: 182.
- 7.- BIGNAMI, A., ENG, L.F., DAHL, D., UYEDA, C.T. (1972): *"Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence"*. Brain Research, 43: 429-435.
- 8.- BILL, A. (1962): *"Autonomic nervous control of uveal blood flow"*. Acta Physiologica Scandinavica, 56: 70-81.
- 9.- BILL, A., STJERNESCHANTZ, J., MANDAHL, A., BRODIN, E., NILSSON, G. (1979): *"Substance P: release on trigeminal nerve stimulation, effects in the eye"*. Acta Physiologica Scandinavica, 106: 371-373.
- 10.- BILL, A. (1991): *"Effects of some neuropeptides on the uvea"*. Experimental Eye Research, 53: 3-11.

- 11.- BJÖRKLUND, H., DAHL, D., OLSON, L., SEIGER, A. (1984a): "*Glial fibrillary acidic protein-like immunoreactivity in the iris: development distribution and reactive changes following transplantation*". *Journal of Neuroscience*, 4: 978-988.
- 12.- BJÖRKLUND, H., DAHL, D., SEIGER, A. (1984b): "*Neurofilament and glial fibrillary acid protein-related immunoreactivity in rodent enteric nervous system*". *Neuroscience*, 12: 277-287.
- 13.- BRÜUN, A., EHINGER, B., SUNDLER, F., TORNQVIST, K., UDDMAN, R. (1984): "*Neuropeptide-Y immunoreactive neurons in the guinea-pig uvea and retina*". *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 24: 1113-1123.
- 14.- BUNGE, M.B. (1986): "*The axonal cytoskeleton: its role in generating and maintaining cell form*". *Trends in Neuroscience*, 9: 477-482.
- 15.- BUTLER, J.M., POWELL, D., UNGER, W.G. (1980): "*Substance P levels in normal and sensorily denervated rabbit eyes*". *Experimental Eye Research*, 30: 311-313.
- 16.- BUTLER, J.M., TERENGHI, G., POLAK, J.M., BLOOM, S.R., COLE, D.F. (1981): "*Distribution of substance P and VIP containing neurones in the uvea*". *Documenta Ophthalmologica*, 67: 386.
- 17.- BUTLER, J.M., RUSKELL, G.L., COLE, D.F., UNGER, W.G., ZHANG, S.Q., BLANK, M.A., MCGREGOR, G.P., BLOOM, S.R. (1984): "*Effects of VIIth (facial) nerve degeneration on vasoactive intestinal polypeptide and substance P levels in ocular and orbital tissues of the rabbit*". *Experimental Eye Research*, 39: 523-532.
- 18.- CASTRO-CORREIA, J. (1961): "*inervação coróideia*". *Anales del Instituto Barraquer*, 213: 487-518.
- 19.- CASTRO-CORREIA, J. (1965): "*Nervous structures of the uveal tract*". En: *Eye Structure* (J.W. Rohen, Ed.); págs: 345-353. Stuttgt: Schattaner-Verlag.
- 20.- CASTRO-CORREIA, J. (1967): "*Studies on the innervation of the uveal tract*". *Ophthalmologica*, 154: 497-520.

- 21.- DAHL, D., CHI, C.H., MILES, L.E., NGUYEN, B.T., BIGNAMI, A. (1982): "*Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Schwann cells: fact or artifact?*". Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 30: 912-918.
- 22.- DAHL, D., CROSBY, C.J., SETHI, J.S., BIGNAMI, A. (1985): "*Glial fibrillary acidic (GFA) protein in vertebrates: immunofluorescence and immunoblotting study with monoclonal and polyclonal antibodies*". Journal of Comparative Neurology, 239: 75-88.
- 23.- DAVISON, P.F., WINSLOW, B. (1974): "*The protein subunit of calf brain neurofilament*". Journal of Neurobiology, 5: 119-133.
- 24.- DUNER, H., VON EULER, U.S., PERNOW, B. (1954): "*Catechol amines and substance P in the mammalian eye*". Acta Physiologica Scandinavica, 31: 113-118.
- 25.- DUKE-ELDER, S., WYBAR, K.C. (1961): "*The nerves of the eye*". En: System of Ophthalmology (S. Duke-Elder, Ed.); vol. II: The anatomy of the visual system; págs: 382-386. London: Henry Kimpton.
- 26.- EHINGER, B. (1964): "*Distribution of adrenergic nerves to orbital structures*". Acta Physiologica Scandinavica, 62: 291-292.
- 27.- EHINGER, B. (1966a): "*Connections between adrenergic nerves and other tissue components in the eye*". Acta Physiologica Scandinavica, 67: 57-64.
- 28.- EHINGER, B. (1966b): "*Adrenergic nerves to the eye and to related structures in man and in the cynomolgus monkey (Macaca irus)*". Investigative Ophthalmology, 5: 42-52.
- 29.- EHINGER, B. (1966c): "*Ocular and orbital vegetatives nerves*". Acta Physiologica Scandinavica, 67 (suppl. 268): 1-35.
- 30.- EHINGER, B. (1966d): "*Localization of ocular adrenergic nerves and barrier mechanisms in some mammals*". Acta Ophthalmologica, 44: 814-822.
- 31.- EHINGER, B. (1966e): "*Distribution of adrenergic nerves in the eye and some related structures in the cat*". Acta Physiologica Scandinavica, 66: 123-128.

- 32.- EHINGER, B., FALCK, B., ROSENGREN, E. (1969): *"Adrenergic denervation of the eye by unilateral cervical sympathectomy"*. Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 177: 206-211.
- 33.- EPSTEIN, M.L., DAVIS, J.P., GELLMAN, L.E., LAMB, J.R., DAHL, J.L. (1988): *"Cholinergic neurons of the chicken ciliary ganglion contain somatostatin"*. Neuroscience, 25: 1053-1060.
- 34.- ERNYEI, I. (1934): *"Ein Beitrag zur Kenntnis der Nerven der Augenhäuten"*. Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 134: 140-154.
- 35.- ESQUERDA, J.E. (1991): *"Estrategias generales en los métodos de inmunomarcaje ultraestructural"*. En: Técnicas de inmunocitoquímica en microscopía electrónica (M. Durfort, S. Vilaró, J. Renau, J. Serratosa, Eds.); págs: 23-32. Barcelona: Publicacions Universitat de Barcelona.
- 36.- EULER, V.S.V., GADDUM, J.H. (1931): *"An unidentified depressor substance in certain tissue extracts"*. Journal of Physiology, 72: 74-87.
- 37.- FALCK, B. (1962a): *"Observations on the possibilities of the cellular localization of monoamines by fluorescence method"*. Acta Physiologica Scandinavica, 56 (suppl. 197): 1-24.
- 38.- FLACK, B. HILLARP, N.A., THIEME, G., TORP, A. (1962b): *"Fluorescence of catechol amines and related compound condensed with formaldehyde"*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 10: 348-356.
- 39.- FALCK, B., ÖWMAN, CH. (1965): *"A detail methodological description of the fluorescence method of the cellular demonstration of biogenic monoamines"*. Acta University of Lund, Section II, 7: 1-23.
- 40.- FLÜGEL-KOCH, C., TAMM, E.T., MAYER, B., LÜTJEN-DRECOLL, E. (1994a): *"Species differences in choroidal vasodilative innervation: Evidence for specific intrinsic nitrenergic and VIP-positive neurons in the human eye"*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 35: 592-599
- 41.- FLÜGEL-KOCH, C., KAUFMAN, P., LÜTJEN-DRECOLL, E. (1994b): *"Association of a choroidal ganglion cell plexus with the fovea centralis"*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 35: 4268-4272.

- 42.- FRANKE, W.W., SCHMID, E., OSBORN, M., WEBER, K. (1978): *"Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy"*. Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America, 75: 5034-5038.
- 43.- FRANKE, W.W., SCHMID, E., SCHILLER, D.L., WINTER, S., JARASCH, E.D., MOLL, R., DENK, H., JACKSON, B.W., ILLMENSEE, K. (1982): *"Differentiation-related patterns of expression of proteins of intermediate-sized filaments in tissue and cultured cells"*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 47: 431-453.
- 44.- FUKUDA, M. (1979): *"Vasomotor nerves on the choroidal blood vessels catecholaminergic innervation"*. Japanese Folia Ophthalmology, 30: 510-513.
- 45.- FUKUDA, M., MATSUSAKA, T. (1980): *"Nerve fibers in the rat choroid"*. Japanese Journal of Medical Sciences Ophthalmology, 24: 112-124.
- 46.- GEISLER, N., KAUFMAN, E., FISCHER, S., PLESSMANN, U., WEBER, K. (1983): *"Neurofilament architecture combines structural principles of intermediate filaments with carboxy-terminal extensions increasing in size between triplet proteins"*. EMBO Journal, 2: 1295-1302.
- 47.- GEISLER, N., PLESSMANN, U., WEBER, K. (1985): *"The complete amino acid sequence of the major mammalian neurofilament protein (NF.L)"*. FEBS Letters, 182: 475-480.
- 48.- GHANDOUR, M.S., LANGLEY, O.K., VINCENDON, G., GOMBOS, G. (1979): *"Double labeling immunohistochemical technique provides evidence of the specificity of glial cell markers"*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 27: 1634-1637.
- 49.- GUGLIELMONE, R., CANTINO, D. (1982): *"Autonomic innervation of the ocular choroid membrane in the chicken"*. Cell and Tissue Research, 222: 417-431.
- 50.- GRIMES, B.A., VON SALZMANN, L. (1960): *"Comparative anatomy of the ciliary nerves"*. Archives of Ophthalmology, 64: 81-91.

- 51.- GRIMES, P.A., McGLINN, A.M., KOEBERLEIN, B., STONE, R.A. (1994): "*Immunoreactivity in autonomic innervation of the cat eye*". Journal of Comparative Neurology, 348: 234-243.
- 52.- HAGGENDAL, J., MALMFORS, T. (1965): "*Identification and cellular localization of the catecholamines in the retina and the choroid of the rabbit*". Acta Physiologica Scandinavica, 64: 58-66.
- 53.- HIROKAWA, N. (1986): "*Quick-freeze, deep-etch visualization of the axonal cytoskeleton*". Trends in Neuroscience, 9: 67-71.
- 54.- HOGAN, M.J., ALVARADO, J.A., WEDDELL, J.E. (1971): "*Histology of the human eye. An atlas and textblock*". Chapter ---: Choroid. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- 55.- JESSEN, K.R., MIRSKY, R. (1980): "*Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein*". Nature, 286: 736-737.
- 56.- JESSEN, K.R., THORPE, R., MIRSKY, R. (1984): "*Molecular identity and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: an immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes*". Journal of Neurocytology, 13: 187-200.
- 57.- JULIEN, J.P., RAMACHADRAN, K., GROSVELD, F. (1985): "*Cloning of cDNA encoding the smallest neurofilament protein from the rat*". Biophysics Acta, 825: 398-404.
- 58.- KIRBY, L.M., DIAB, M.I., MATTIO, T.G. (1978): "*Development of adrenergic innervation of the iris and fluorescent ganglion cells in the choroid of the chick eye*". Anatomical Record, 191: 311-320.
- 59.- KOELLE, G.B., WOLFAND, L., FRIEDENWALD, J.S., ALLEN, R.H. (1962): "*Localization of specific cholinesterase in ocular tissues of the cat*". American Journal of Ophthalmology, 35: 1580-1584.
- 60.- KUMMER, W., FISCHER, A., MUNDEL, P. (1992): "*Nitric oxidesynthase in vip containing vasodilator nerve fibers in the guinea pig*". Neuroreport, 3: 653-655.

- 61.- KURUS, E. (1955): "*Über ein ganglienzellsystem der Menschlichen Aderhaut*". Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde, 127: 198.
- 62.- KUWAYAMA, Y., GRIMES, P.A., PONTE, B., STONE, R.A. (1987): "*Autonomic neurons supplyng the rat eye and the intraorbital distribution of vasoactive intestinal polypeptide (vip)-like immunoreactivity*". Experimental Eye Research, 44: 907-922.
- 63.- LARSSON, L.I., FAHRENKRUG, J., SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL, O., SUNDLER, F., HAKANSON, R., REHFELD, J.F. (1976): "*Localization of vasoacitve intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons*". Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America, 73: 3197-3200.
- 64.- LATIES, A.M., JACOBOWITZ, D. (1966): "*A comparative study of the autonomic innervation of the eye in monkey, cat, and rabbit*". Anatomical Record, 156: 383-396.
- 65.- LATIES, A.M. (1974): "*Ocular melanin and the adrenergic innervation to the eye*". Transactions of the American Academy of Ophthalmology, 72: 561-605.
- 66.- LAZARIDES, E. (1980): "*Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space*". Nature, 283: 249-256.
- 67.- LIEM, R.K.H., YEN, S.H., SOLOMON, G.D., SHELANSKI, M.L. (1978): "*Intermediate filaments in nervous tissues*". Journal of Cell Biology, 79: 637-645.
- 68.- LIEM, R.K.H., KEITH, C.H., LETERRIER, J.F., TRENCKNER, E., SHELANSKI, M.L. (1981): "*Chemistry and biology of neuronal and glial intermediate filaments*". Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology, 46: 341-350.
- 69.- LYNETTE-FEENEY, A.B., HOGAN, M.J. (1961a): "*Electron microscopy ot the human choroid. I.- Cells and supporting structures*". American Journal of Ophthalmology, 51: 185-200.

- 70.- LYNETTE-FEENEY, A.B., HOGAN, M.J. (1961b): *"Electron microscopy of the human choroid. II.- The choroidal nerves"*. American Journal of Ophthalmology, 51: 200-210.
- 71.- LISS L. (1956): *"The astroglia of the human optic nerve, chiasma and tract. A study with silver-carbonate"*. Journal of Neurology, 105: 151-160.
- 72.- LUNDBERG, J.M., HÖKFELT, T., NILSSON, G., TERENIUS, L., REHFELD, J., ELDER, R., SAID, S. (1978): *"Peptide neurons in the vagus splanchnic and scitatic nerves"*. Acta Physiologica Scandinavica, 104: 499-501.
- 73.- LUNDBERG, J.M. (1979a): *"Enkephalin, substance P, VIP, somatostatin, gastrin/CCK and neurotensin in peripheral neurons"*. Acta Physiologica Scandinavica, 473: 14.
- 74.- LUNDBERG, J.M., HÖKFELT, T., SCHULTZBERG, M., UVNÄSWALLENSTEN, K. (1979b): *"Occurrence of vasoactive intestinal polipeptide (VIP)-like immunoreactivity in certain cholinergic neurons of the cat: evidence from combined immunohistochemistry and acetylcholinesterase staining"*. Neuroscience, 4: 1539-1559.
- 75.- LUNDBERG, J.M., TERENIUS, L., HÖKFELT, T., CLAES, R.M., TATEMOTO K., MUTT, U., POLAK, J., BLOOMS, S., GOLDSTEIN, M. (1982): *"Neuropeptide Y (NPY) like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effect of NPY on sympathetic function"*. Acta Physiologica Scandinavica, 116: 477-480.
- 76.- LUNDBERG, J.M., TERENIUS, L., HÖKFELT, T., GOLDSTEIN, M. (1983): *"High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man"*. Neuroscience Letters, 42: 167-172.
- 77.- LUNDBERG, J.M., ÄNGGARD, A., PERNOW, J., HÖKFELT, T. (1985): *"Neuropeptide Y, substance P., and VIP immunoreactive nerves in cat spleen in relation to autonomic vascular and volume control"*. Cell Tissue Research, 239: 9-18.
- 78.- MALMFORS, T. (1965): *"The adrenergic innervation of the eye as demonstrated by fluorescence microscopy"*. Acta Physiologica Scandinavica, 65: 259-267.

- 79.- MATTEUCCI, P. (1949): *"Il sistema nervoso autonomo nella fisiopatologia oculare"*. Rosenber e Sellera. Torino (Citado por Castro-Correia []).
- 80.- MATSUSAKA, T. (1981): *"An evidence for adrenergic involvement in the choroidal circulation"*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 216: 17-21.
- 81.- MATSUSAKA, T. (1982): *"Cytoarchitecture of choroidal melanocytes"*. Experimental Eye Research, 35: 461-469.
- 82.- MATUS, A. (1988): *"Neurofilament protein phosphorylation-where, when and why"*. Trends in Neuroscience, 11: 291-292.
- 83.- MAWAS, J. (1936): *"Les cellules nerveuses ganglionnaires de la choroïde chez l'homme"*. Bulletin des Sociétés d'Ophtalmologie de France, 48: 172.
- 84.- MAWAS, J. (1952): *"Sur l'innervation vaso-motrice de la choroïde"*. Comptes Rendus de l'Association des Anatomistes, 69: 679.
- 85.- MILLER, A.S., COSTER, D.J., COSTA, M., FURNESS, J.B. (1983): *"Vasoactive intestinal polypeptide immunoreactive nerve fibres in the human eye"*. Australian Journal of Ophthalmology, 11: 185-193.
- 86.- MOKUNO, K., KAMHOLZ, J., BEHRMAN, T., BLACK, C., SESSA, M., FEINSTEIN, D., LEE, V., PLEASURE, D. (1989): *"Neuronal modulation of Schwann cell glial fibrillary acidic protein (GFAP)"*. Journal of Neuroscience Research, 23: 396-405.
- 87.- MÜLLER, H. (1857): *"Über glatte Muskelfasern und Nervenflechte der choroidea in Menschlichen Auge"*. Verhandl d. Würzburg Physik-Mediz. Gesellsch; Bd.X, Heftzund. (Citado por Duke-Elder []).
- 88.- NAGLE, R.B. (1988): *"Intermediate filaments: a review of the basic biology"*. American Journal of Surgical Pathology, 12 (Suppl. 1): 4-16.
- 89.- NAKANE, P.K., PIERCE, G.B. (1966): *"Enzyme labeled antibodies for the light and electron microscopie localization of tissue antigens"*. Journal of Cell Biology, 33: 307.

Referencias Bibliográficas.

- 90.- NICKEL, R., SCHUMMER, A., SEIFERLE, E. (1992): *"Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band IV: Nervensystem, Sinnesorgane, Endocrine Drüsen (3ª Ed.)"*. Berlin: P. Parey.
- 91.- NILSSON, S.F.E., BILL, A. (1984): *"Vasoactive intestinal polypeptide (VIP): Effects in the eye and on regional blood flows"*. Acta Physiologica Scandinavica, 121: 385-392.
- 92.- NILSSON, S.F.E., LINDER, J., BILL, A. (1985): *"Characteristics of uveal vasodilation produced by facial nerve stimulation in monkeys, cats and rabbits"*. Experimental Eye Research, 40: 841-852.
- 93.- NIXON, R.A., LEWIS, S.E. (1986): *"Differential turnover of phosphate groups on neurofilament subunits in mammalian neurons in vitro"*. Journal of Biological Chemistry, 261: 16258-16301.
- 94.- NUZZI, R., GUGGLIELMONE, R., GRIGNOLO, F.M. (1992): *"Fluorescent histochemical demonstration of adrenergic terminations in the human choroid"*. Experimental Eye Research, 55 (Suppl. 1): 50.
- 95.- OLSON, L., MALMFORS, T. (1970): *"Growth characteristic of adrenergic nerves in the adult rat"*. Acta Physiologica Scandinavica (Suppl. 348): 1-112.
- 96.- RAMÍREZ, J.M. (1983): *"Estudio de la vascularización de la papila del nervio óptico por el método de diafanización y relleno con polímeros de baja densidad"*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- 97.- RAMÍREZ, J.M., TRIVIÑO, A., RAMÍREZ, A.I., GARCÍA-SÁNCHEZ, J. (1989): *"Study of the choroidal innervation through immunocytochemical technics"*. En: II International Symposium on the Choroid (R.W. Flower, Ed.); págs: 32-42. Maryland.
- 98.- RAMÍREZ, J.M., DE HOZ, R., SALAZAR J.J., RAMÍREZ, A.I., TRIVIÑO, A., GARCÍA-SÁNCHEZ, J. (1990): *"Fibras amielínicas coroideas. Estudio inmunohistoquímico"*. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología Invest, 3: 77-82.
- 99.- RAMÓN Y CAJAL, S., DE CASTRO, F. (1933): *"Elementos de técnica micrográfica del Sistema Nervioso"*. 409 págs. Madrid: Tipografía Artística.

- 100.- REEH, M.J., WOBIG, J.L., WIRTSCHAFTER, J.D. (1981): "*Ophthalmic anatomy. A manual with some clinical applications*". Chapter 3: Ophthalmic Neuroanatomy; págs: 272-278. Rochester (Minnesota): Custom Printing INC.
- 101.- ROSSI, F. (1936): "*Studi sull'innervazione della tonica vascolare dell'occhio*". Ricerche di Morfologie, 16: 1.
- 102.- RUNGE, M.S., WILLIAMS, R.C.Jr. (1981): "*Formation of an ATP-dependent microtubule-neurofilament complex in vitro*". Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology, 46: 413-429.
- 103.- RUSKELL, G.L. (1970a): "*The orbital branches of the pterigopalatine ganglion and their relationship with internal carotid nerve branches in primates*". Journal of Anatomy, 106: 323-339.
- 104.- RUSKELL, G.L. (1970b): "*An ocular parasympathetic nerve pathway of facial nerve origin and its influence on intraocular pressure*". Experimental Eye Research, 10: 319-330.
- 105.- RUSKELL, G.L. (1971): "*Facial parasympathetic innervation of the choroidal blood-vessels in monkeys*". Experimental Eye Research, 12: 166-172.
- 106.- SALZMANN, M. (1912): "*The Anatomy and Histology of the human eye ball in the normal state. Its development and senescence*". Translated by E.V.L. Brown; Chapter V: The chorioidea (chorioides), págs: 51-52. Chicago: University of Chicago Press.
- 107.- SCHLIWA, M. (1985): "*Intermediate Filaments*". En: The cytoskeleton, an introductory survey. Cell Biology Monographs, vol. 13: 82-124. New-York: Springer-Verlag.
- 108.- SCHWEIGER, C. (1860): "*Über die Ganglion Zellen und blassen Nerven der Chorioidea*". Graefe's Archives for Clinical and Experimental Ophthalmology, 6: 320-322.

- 109.- SCHULTZBERG, M., HÖKFELTT, T., NILSSON G., TERENIUS, L., REHFELD, J.F., BROWN, M., ELDE, R., GOLDSTEIN, M., SAID S. (1980): "*Distribution of peptide and catecholamine-containing neurons in the gastrointestinal tract of rat and guinea pig: immunohistochemical studies with antisera to substance P, vasoactive intestinal peptide, enkephalins, somatostatin, gastrin, cholecystokinin β -hydroxylase*". Neuroscience, 5: 689-744.
- 110.- SEIGER, A., DAHL, D., AYER-LELIEVRE C., BJÖRKLUND, H. (1984): "*Appearance and distribution of neurofilament immunoreactivity in iris nerves*". Journal of Comparative Neurology, 223: 457-470.
- 111.- SHAW, G., WEBER, K. (1984): "*The intermediate filament complement of the retina: a comparison between different mammalian species*". European Journal of Cell Biology, 33: 95-104.
- 112.- SHIMIZU, Y. (1982): "*Localization of neuropeptides in the cornea and uvea of the rat: an immunohistochemical study*". Cellular and Molecular Biology, 28: 103-110.
- 113.- STEINERT, P.M., STEVEN A.C., ROOP, D.R. (1985): "*The molecular biology of intermediate filaments*". Cell, 42: 411-419.
- 114.- STEINERT, P.M. ROOP, D.R. (1988): "*Molecular and cellular biology of intermediate filaments*". Annals Reviews of Biochemistry., 57: 593-625.
- 115.- STEINER, P.M., LIEM, R.K.H. (1990): "*Intermediate filament dynamics*". Cell, 60: 521-523.
- 116.- STEPHEN. M., PILAR, G. (1987): "*Cholinergic innervation of the smooth muscle cells in the choroid coat of the chick eye and its development*". Journal of Neuroscience, 7: 3827-3839.
- 117.- STERNBERGER, L.A., HARDY, P.H., CUCULIS, J.J., MEYER, H.G. (1970): "*The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes*". Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 18: 315-333.

- 118.- STÖHR, P.J.R. (1926): "*Über die Innervation der Harnblase und der Samenblase beim Menschen*". Zeitschrift für anatomie und entwicklungsfeschichte, 78: 555. (Citado por Castro-Correia []).
- 119.- STONE, R.A., LATIES, A.M. (1983): "*Pancreatic polypeptide-like immunoreactive nerves in the guinea pig eye*". Investigative Ophthalmology and Visual Science, 24: 1620-1623.
- 120.- STONE, R.A., KUWAYAMA, Y., LATIES, A.M., MC GLINN, A.M., SCHMIDT, M.L. (1984): "*Guinea-pig ocular nerves contain a peptide of the cholecystokinin/gastrin family*". Experimental Eye Research, 39: 387-391.
- 121.- STONE, R.A., KUWAYAMA Y. (1985): "*Substance P-like immunoreactive nerves in the human eye*". Archives of Ophtalmology, 103: 1207-1211.
- 122.- STONE, R.A. (1986a): "*Neuropeptide Y and the innervation of the human eye*". Experimental Eye Research, 42: 349-355.
- 123.- STONE, R.A. (1986b): "*Vasoactive intestinal polypeptide and the ocular innervation*". Investigative Ophthalmology and Visual Science, 27: 951-957.
- 124.- STONE, R.A., TERVO, T., TERVO K., TARKHANEN, A. (1986c): "*Vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactive nerves to the human eye*". Acta Ophthalmologica, 64: 12-18.
- 125.- STONE, R.A., MC GLINN, A.M. (1988a): "*Calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerves in human and Rhesus monkey eyes*". Investigative Ophthalmol and Visual Science, 29: 305-310.
- 126.- STONE, R.A., MC GLINN, A.M., KUWAYAMA, Y. (1988b): "*Galanin-like immunoreactive nerves in the porcine eye*". Experimental Eye Research, 46: 457-461.
- 127.- STRÖMBERG, I., BJÖRKLUND, H., MELANDER, T., RÖKAEUS, A., HÖKFELT, T., OLSON, L. (1987): "*Galanin-immunoreactive nerves in the rat iris: alterations induced by denervation*". Cell Tissue Research, 250: 267-275.

- 128.- SUGITA, A., YOSHIOKA, H. (1984): "*Effects of superior cervical ganglionectomy on choroidal melanocytes in pigmented rabbit eye*". Japanese Journal of Medical Sciences Ophthalmologie, 28: 62-68.
- 129.- SUNDLER, F., HAKANSON, R., EKBLAD, E., UDDMAN, R., WAHBESTEDT, C. (1986): "*Neuropeptide Y in the peripheral adrenergic and enteric nervous systems*". International Review of Cytology, 102: 243-249.
- 130.- TATEMOTO, K. (1982): "*Neuropeptide Y: complete aminoacid sequence of the brain protein*". Proceedings of The National Academic of Sciences of the United States of America, 79: 5485-5489.
- 131.- TASSCOT, S.J., BENNETT, G.S., HOLTZEN, H. (1983): "*Neuronal precursor cells in the chick neural tube express neurofilament protein*". Nature, 292: 836-838.
- 132.- TERENGHI, G., POLAK, J.M., PROBERT, L., MCGREGOR, G.P., BLANK, M.A., BUTLER, J.M., UNGER, W.G., ZHANG S.Q., COLE, D.F., BLOOM, S.R. (1982): "*Mapping, quantitative distribution and origin of substance P- and VIP- containing nerves in the uvea of guinea pig eye*". Histochemistry, 75: 399-417.
- 133.- TERENGHI, G., POLAK, J.M., ALLEN, J.M., ZHANG, S.Q., UNGER, W.G., BLOOM, S.R. (1983): "*Neuropeptide Y-immunoreactive nerves in the uvea of guinea pig and rat*". Neuroscience Letters, 42: 33-38.
- 134.- TERENGHI, G., POLAK, J.M., GHATEL, M.A., MULDERY, P.K., BUTLER, J.M., UNGER, W.G., BLOOM, S.R. (1985): "*Distribution and origin of calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the sensory innervation of the mammalian eye*". Journal of Comparative Neurology, 233: 506-516.
- 135.- TERENGHI, G., ZHANG, S.Q., UNGER, W.G., POLAK, J.M. (1986): "*Morphological changes of sensory CGRP-immunoreactive and sympathetic nerves in peripheral tissues following chronic denervation*". Histochemistry, 86: 89-95.

- 136.- TERVO, K., TERVO, T., ERÄNKÖ, L., ERÄNKÖ, O., VALTONEN, S., CLAUDIO CUELLO, A. (1982): *"Effect of sensory and sympatethic denervation on substance P immunoreactiity in nerve fibres of the rabbit eye"*. Experimental Eye Research, 34: 577-585.
- 137.- TOLIVIA, D. (1975): *"Un nuevo método sencillo y constante para la impregnación argéntica de la glía astrocitaria y una variante del mismo aplicable a la rápida y segura demostración de las fibras reticulares"*. Trabajos del Instituto Cajal de Investigaciones Biológicas, 67: 247-258.
- 138.- TRIVIÑO, A., RAMÍREZ, J.M. (1989): *"Anatomofisiología de la coroides"*. En: La circulación coroidea (F. Gomez-Ulla, F. Marín, J.M. Ramírez, A. Triviño, Eds.); cap. 1, págs: 7-29. Barcelona: Edika Med.
- 139.- TSUKITA, S., ISHIKAWA, H., KUROKAWA, M. (1981): *"Isolation of 10-nm filaments from astrocytes in the mouse optic nerve"*. Journal of Cell Biology, 88: 245-250.
- 140.- UDDMAN, R., ALUMETS, J., EHINGER, B., HAKANSON, R., LOREN, I., SUNDLER, F. (1980): *"Vasoactive intestinal peptide nerves in ocular and orbital structures of the cat"*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 19: 878-885.
- 141.- UNGER, W.G., BUTLER, J.M., BLOOM, S.R. (1981): *"Substance P, vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and somatostatin levels in ocular tissue of normal and sensorily denervated rabbit eyes"*. Experimental Eye Research, 32: 797-801.
- 142.- UUSITALO, H., LEHTOSALO, J., PALKAMO, A., TOIVANEN, M. (1984): *"Vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like immunoreactivity in the human and guinea-pig choroid"*. Experimental Eye Research, 38: 435-437.
- 143.- UUSITALO, H., LEHTOSALO, J.I., PALKAMA, A. (1985): *"Vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-immunoreactive nerve fibers in the anterior uvea of the guinea pig"*. Ophthalmic Research, 17: 235-240.
- 144.- UUSITALO, H., KROOTILA, K., PALKAMA, A. (1989): *"Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactive sensory nerves in the human and guinea pig uvea and cornea"*. Experimental Eye Research, 48: 467-475.

- 145.- UYEDA, C.T., ENG, L.F., BIGNAMI, A. (1972): "*Immunological study of the glial fibrillary acidic protein*". Brain Research, 37: 81-89.
- 146.- WILLARD, M., SIMON, C. (1981): "*Antibody decoration of neurofilaments*". Journal of Cell Biology, 89: 198-205.
- 147.- WOLTER, J.R (1955): "*Melanoblast of the normal human choroid*". Archives of Ophthalmology, 53: 211-214.
- 148.- WOLTER, J.R. (1960): "*Nerves of the normal human choroid*". Archives of Ophthalmology, 64: 120-124.
- 149.- VADOUD-SEYEDI, J., LESPARGNARD, L., RENARD, N., DERAEMAECER, R., GHANEM, G.E. (1994): "*Immunohistological evaluation of neurofilament 200 as an early nerve regeneration marker*". Research in Surgery, 6: 18-21.
- 150.- WIEDENMANN, B., FRANKE, W.W. (1985): "*Identification and localization of synaptophysin an integral membrane glycoprotein of MR 38000 characteristic of presynaptic vesicles*". Cell, 41: 1017-1028.
- 151.- WEATHERHEAD, B. (1988): "*Melanotropins and melanin pigmentation in the skin of mammals*". En: The melanotropic peptides (M.E. Hadley, Ed.), Vol. II, págs: 1-19. CRC Press Inc.
- 152.- WUERKER, R., KIRKPATRICK, J.B. (1972): "*Neuronal microtubules, neurofilaments and microfilaments*". International Reviews of Cytology, 33: 45-57.
- 153.- YEN, S.H., FIELDS, K.L. (1981): "*Antibodies to neurofilament, glial filament, and fibroblast intermediate filament protein bind to different cell types of the nervous system*". Journal of Cell Biology, 88: 115-126.

COMISIONA DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS DE LA UNAM

TITULADA Estudio de la inervación cefálica
mediante la utilización de FA y neurofilamentos.
DE LA C. Rosa de Hoz

Montañana

OBTUVO POR LA COMISIONA DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS DE LA UNAM CUM LAUDE POR UNANIMIDAD

Madrid, 3 de JULIO de 1995

El Presidente,

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal Secretario

M. Solas

M. Solas